

Université de Montréal

**Rôle de l'extrémité C-terminale dans l'expression
du canal calcique $\text{Ca}_v1.2$ à la membrane plasmique**

Par
Florian Le Coz

Département de Physiologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences
En physiologie
Option Physiologie et biophysique moléculaires

Juillet, 2009

© Florian Le Coz, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Rôle de l'extrémité C-terminale dans l'expression
du canal calcique $Ca_v1.2$ à la membrane plasmique

Présenté par :

Florian Le Coz

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Lucie Parent, directeur de recherche
Dr Céline Fiset, président rapporteur
Dr Audrey Claing, membre du jury

RÉSUMÉ

Le canal calcique de type L, $Ca_v1.2$, joue un rôle clé dans le couplage excitation-contraction des myocytes ventriculaires. Il a été montré que la sous-unité $Ca_v\alpha1$ était sujette à l'épissage alternatif et que ce phénomène pouvait mener à une protéine tronquée en C-terminal au niveau de l'exon 45 (Liao, Yong et al. 2005). D'autres groupes ont étudié différentes délétions au niveau de l'extrémité C-terminale (De Jongh, Warner et al. 1991; Gao, Cuadra et al. 2001). Les courants mesurés dans la configuration cellule entière, était significativement plus grands que le canal « pleine longueur ». Nous avons décidé de tester certaines de ces délétions ($\Delta C2030$, $\Delta C1935$, $\Delta C1856$, $\Delta C1733$, $\Delta C1700$) en présence ou en absence de la sous-unité auxiliaire $Ca_v\beta3$, susceptible d'interagir avec l'extrémité C-terminale de la sous-unité $Ca_v\alpha1$ par l'intermédiaire de son domaine SH3 (Lao, Kobrinsky et al. 2008). Les résultats obtenus dans les ovocytes de Xénope ont mis en évidence que les sous-unités $Ca_v\alpha1.2$ tronquées montraient des courants globaux plus élevés que le canal « pleine longueur » en présence de la sous-unité auxiliaire $Ca_v\beta3$ et que les sous-unités $Ca_v\alpha1.2$ tronquées donnaient des courants en absence de la sous-unité $Ca_v\beta3$ contrairement à la sous-unité $Ca_v\alpha1.2$ « pleine longueur ». Afin de vérifier si l'augmentation des courants macroscopiques était le résultat d'une augmentation du nombre de sous-unités $Ca_v\alpha1.2$ à la membrane, nous avons choisi de quantifier la fluorescence spécifiquement due à cette sous-unité en utilisant la méthode de cytométrie de flux (FACS : « Fluorescence Activated Cell Sorting »). L'épitope HA a été inséré dans une région extracellulaire de la sous-unité $Ca_v\alpha1$ du canal calcique $Ca_v1.2$ et un anticorps anti-HA couplé au FITC (« Fluorescein IsoThioCyanate ») a été utilisé pour observer la fluorescence. Nos résultats confirment que la sous-unité $Ca_v\alpha1$ -HA du canal calcique $Ca_v1.2$, s'exprime à la membrane plasmique en présence de la sous-unité auxiliaire $Ca_v\beta3$, et qu'en absence de celle-ci, ne s'exprime que peu ou pas à la membrane. Les mêmes résultats ont été obtenus pour les trois délétions testées dans les mêmes conditions soit $Ca_v\alpha1.2$ -HA $\Delta C1935$, $Ca_v\alpha1.2$ -HA $\Delta C1856$ et $Ca_v\alpha1.2$ -HA $\Delta C1733$. Ensemble, ces résultats suggèrent que l'augmentation des courants macroscopiques observés après une délétion partielle du C-terminal n'est pas causée par une augmentation du nombre de protéines $Ca_v\alpha1.2$ à la membrane.

Mots clés : Calcium, canal ionique, « gating », mutagénèse dirigée, FACS, électrophysiologie, immunobuvardage de type Western.

ABSTRACT

The L-type calcium channel, $\text{Ca}_v1.2$, plays an important role in the excitation-contraction coupling of the ventricular myocytes. It has been shown that the alternative splicing of $\text{Ca}_v\alpha1.2$ subunit could lead to a truncated protein in the C-terminus at exon 45 (Liao, Yong et al. 2005). Many groups have studied deletions in the C-terminus (De Jongh, Warner et al. 1991; Gao, Cuadra et al. 2001). The currents, measured in the whole cell configuration, were significantly higher with the full-length channel. We chose to test some of these deletions ($\Delta\text{C}2030$, $\Delta\text{C}1935$, $\Delta\text{C}1856$, $\Delta\text{C}1733$, $\Delta\text{C}1700$) in the presence or absence of the $\text{Ca}_v\beta3$ auxiliary subunit which is likely to interact with the C-terminus of the $\text{Ca}_v\alpha1.2$ subunit through its SH3 domain (Lao, Kobrinsky et al. 2008). The truncated $\text{Ca}_v\alpha1.2$ subunit, expressed in *Xenopus* Oocytes, showed macroscopic currents that were greater than those of the full length channel in presence of the $\text{Ca}_v\beta3$ subunit. In addition, the truncated $\text{Ca}_v\alpha1.2$ subunits displayed currents in the absence of the $\text{Ca}_v\beta3$ subunit in contrast with the $\text{Ca}_v\alpha1.2$ full length subunit. To investigate whether the larger macroscopic currents resulted in an increase in the number of $\text{Ca}_v\alpha1.2$ subunits at the plasma membrane, we chose the FACS (« Fluorescence Activated Cell Sorting ») method. An HA-tag was inserted in an extracellular region of the $\text{Ca}_v\alpha1.2$ subunit and a FITC (« Fluorescein IsoThioCyanate ») coupled anti-HA antibody was used to measure fluorescence. Our results showed that the $\text{Ca}_v\alpha1.2$ -HA subunit of L- type channel is expressed at the plasma membrane in the presence of the $\text{Ca}_v\beta3$ subunit whereas the $\text{Ca}_v\alpha1.2$ -HA subunit is slightly or not expressed at the plasma membrane in its absence. The same results were obtained for the three C-terminal deletions tested under the same conditions ($\text{Ca}_v\alpha1.2$ -HA $\Delta\text{C}1935$, $\text{Ca}_v\alpha1.2$ -HA $\Delta\text{C}1856$ and $\text{Ca}_v\alpha1.2$ -HA $\Delta\text{C}1733$). Taken together, these results suggest that the increased macroscopic currents observed after a partial deletion of the C-terminus is not caused by an increased number of $\text{Ca}_v\alpha1.2$ proteins expressed at the plasma membrane.

Keywords: Calcium, ion channel, gating, directed mutagenesis, FACS, electrophysiology, Western-Blot.

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Le calcium intracellulaire, et son rôle dans le couplage excitation-contraction musculaire.....	1
1.1.1 Entrée du calcium dans la cellule via les canaux de la membrane plasmique.....	3
1.1.1.1 Les canaux calciques de type VDCC.....	3
1.1.1.1.1 Les canaux calciques de type HVA.....	5
1.1.1.1.2 Les canaux calciques de type LVA.....	6
1.1.1.2 Les canaux calciques de type TRP.....	9
1.1.1.3 Les canaux calciques de type ROC.....	10
1.1.1.4 Les canaux calciques de type SOC.....	10
1.2 Propriétés des canaux calciques dépendants du voltage VDCC.....	11
1.2.1 Propriétés structurales.....	11
1.2.1.1 La sous-unité principale $Ca_v\alpha_1$	13
1.2.1.2 La sous-unité $Ca_v\beta$	16
1.2.1.3 La sous-unité $Ca_v\alpha_2\delta$	20
1.2.1.4 La sous-unité $Ca_v\gamma$	22
1.2.2 Propriétés biophysiques.....	22
1.2.2.1 L'activation.....	23
1.2.2.2 L'inactivation.....	30
1.2.3 Modulation des propriétés de gating par les sous-unités auxiliaires.....	35
1.3 Le rôle de l'extrémité C-terminale du canal calcique $Ca_v1.2$	36
1.3.1 La sous-unité $Ca_v1.2$ tronquée en C-terminal.....	36
1.3.2 Interaction avec la calmoduline.....	37
1.3.3 Régulation par des kinases et des phosphatases.....	38
1.3.3.1 Régulation par des kinases.....	38
1.3.3.2 Phosphorylation par des phosphatases.....	39
1.4 Objectifs et hypothèses.....	39
1.4.1 Les délétions en C-terminal.....	39
1.4.2 L'expression dans les cellules HEKT.....	40
1.4.3 Hypothèses.....	41

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	43
2.1 Méthodes de biologie moléculaire.....	43
2.1.1 Matériel utilisé.....	43
2.1.2 Préparation d'ADN.....	43
2.1.3 Synthèse d'ARN.....	44
2.2 Culture cellulaire et transfection des cellules.....	43
2.2.1 Culture cellulaire.....	44
2.2.2 Transfection des cellules.....	45
2.3 Immunobuvardage de type Western.....	46
2.3.1 Lysat cellulaire.....	46
2.3.2 Immunobuvardage de type Western.....	46
2.3.2.1 Gel SDS-Page.....	46
2.3.2.2 Immunomarquage.....	46
2.3.2.3 Révélation par chimioluminescence.....	46
2.4 Technique de FACS (« Fluorescence Activated Cell Sorting »).....	48
2.5 Expression fonctionnelle des canaux.....	50
2.6 Enregistrements électrophysiologiques.....	52
 3. RÉSULTATS.....	 52
3.1 Résultats préliminaires	52
3.1.1 La délétion $\Delta C1935$	52
3.1.2 Les délétions $\Delta C2030$, $\Delta C1856$, $\Delta C1733$ et $\Delta C1700$	56
3.2 L'expression dans les cellules.....	58
3.2.1 L'insertion de l'étiquette HA.....	59
3.2.2 Vérification de la validité des constructions par immunobuvardage de type Western et électrophysiologie.....	61
3.2.2.1 Le canal calcique $Ca_v1.2$ -HA « pleine longueur ».....	61
3.2.2.2 La délétion $\Delta C1935$	63
3.2.2.3 Les délétions $\Delta C1856$ et $\Delta C1733$	65
3.3 Expériences de FACS (« Fluorescence Activated Cell Sorting »).....	66
3.3.1 Le canal calcique $Ca_v\alpha 1.2$ « pleine longueur ».....	66
3.3.2 Le canal calcique $Ca_v\alpha 1.2$ tronqué en position 1935.....	69
3.3.3 Le canal calcique $Ca_v\alpha 1.2$ tronqué en position 1856.....	71

3.3.4	Le canal calcique $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ tronqué en position 1733.....	74
4.	DISCUSSION.....	78
4.1	La délétion de 140 à 300 acides aminés ne change pas le patron d'adressage des sous-unités $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ à la membrane dans les cellules HEKT.....	79
4.2	Travaux précédents sur le rôle du C-terminal de $\text{Ca}_v\alpha 1.2$	82
4.3	Limites expérimentales de nos expériences.....	84
5.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	88
6.	RÉFÉRENCES.....	90

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I.	Classification, localisation tissulaire, et propriétés pharmacologiques des canaux VDCC.....	8
Tableau II.	Propriétés biophysiques des canaux VDCC.....	9
Tableau III.	Alignement des motifs DEKA et EEEE des canaux Na^+ et Ca^{2+}	15
Tableau IV.	Isoformes de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ connues jusqu'à présent, leur position sur le chromosome humain, leur rôle physiologique et leur localisation tissulaire.	17
Tableau V.	Position sur le chromosome humain, poids moléculaire apparent, rôle et localisation tissulaire des isoformes de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha2\delta$	21
Tableau VI.	Propriétés biophysiques en Barium de la mutation ΔC1935 comparée avec le canal de type sauvage.....	55
Tableau VII.	Propriétés biophysiques en Barium du canal $\text{Ca}_v1.2$ tronqué en position 2030, 1856 et 1733 comparé avec le canal $\text{Ca}_v1.2$ de type sauvage.....	57
Tableau VIII.	Tableau comparatif des propriétés biophysiques de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha1$ du canal $\text{Ca}_v1.2$ avec et sans l'épitope HA.....	62
Tableau IX.	Tableau comparatif des propriétés biophysiques de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha1$, (sauvage-HA et tronqué en position ΔC1935) de $\text{Ca}_v1.2$ dans le vecteur pCMV-Tag-HA.....	64
Tableau X.	Pourcentage de cellules fluorescentes selon les différentes conditions de transfection dans les cellules HEKT.....	77
Tableau XI.	Tableau comparatif des propriétés biophysiques de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha1$, (sauvage, sauvage-HA, tronquée en position ΔC1935 , tronquée en position $\Delta\text{C1935-HA}$) de $\text{Ca}_v1.2$ dans les vecteurs pCMV-Tag5 et pGEM en présence ou en absence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta3$	87

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Structure tertiaire prédite des canaux calciques de la famille des VDCC.....	12
Figure 2.	Structure secondaire prédite de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$ des VDCC.....	13
Figure 3.	Alignement des séquences du domaine AID de différents canaux Ca_v1 et Ca_v2 ...	15
Figure 4.	Homologie entre les trois sous-familles de canaux calciques Ca_v1 , Ca_v2 , Ca_v3 ...	16
Figure 5.	Structure tertiaire prédite de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 2a$	18
Figure 6.	Structure cristallographique de l'interaction entre le AID de la sous-unité $\text{Ca}_v1.2$ et l'ABP de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 2a$	19
Figure 7.	Analogie de séquence entre canaux calciques, sodiques et potassiques.....	24
Figure 8.	Les trois modèles proposés quant au mouvement du segment S4 lors d'une dépolarisation.....	27
Figure 9.	Le mouvement du segment S4, dernier modèle proposé à ce jour.....	27
Figure 10.	Alignement de séquence du segment 6 ou TM2 de certains canaux potassiques avec le canal calcique $\text{Ca}_v1.2$	29
Figure 11.	Schématisation du modèle du « Ball and Chain » qui inactive le canal.....	32
Figure 12.	Structure cristalline du complexe Ca^{2+} / Calmoduline / domaine IQ.....	33
Figure 13.	Interaction s'effectuant lors de la formation du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{Domaine IQ}$	34
Figure 14.	Courants macroscopiques en barium avec la délétion ΔC1935	52
Figure 15.	Immunobavardage de type Western montrant la présence de la délétion ΔC1935 dans les lysats d'ovocytes de Xénope.....	53
Figure 16.	Courant globaux de $\text{Ca}_v1.2$ de type sauvage ou tronqué en position 1935 observés 72h après injection de l'ARN dans les ovocytes de Xénope.....	54
Figure 17.	Expression du canal $\text{Cav}1.2$ dans le vecteur pRC-CMV transfecté dans les cellules HEK en immunobavardage de type Western.....	58
Figure 18.	Expression de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ (vecteur pGW1H) transfecté dans les cellules HEKT en immunobavardage de type Western.....	59
Figure 19.	Structure secondaire prédite de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$ du canal $\text{Ca}_v1.2$ montrant le site d'insertion de l'épitope HA.....	60
Figure 20.	Immunobavardage de type Western mettant en évidence la synthèse de la sous-unité $\text{Ca}_v1.2$ avec et sans la délétion ΔC1935 en présence ou non de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$	63
Figure 21.	Immunobavardage de type Western mettant en évidence la synthèse de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$ du canal $\text{Ca}_v1.2$ avec les délétions ΔC1856 et ΔC1733 en présence ou en absence de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$	65
Figure 22.	Résultats d'une expérience de FACS montrant la fluorescence des cellules HEKT transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA « pleine longueur » en présence ou en absence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$	67
Figure 23.	Histogramme comparant le nombre de cellules fluorescentes mesurées en condition témoin (HEK non transfectées) avec le nombre de cellules fluorescentes transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA « pleine longueur » mesuré en présence et en absence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$	68
Figure 24.	Résultats d'une expérience de FACS montrant la fluorescence des cellules HEKT transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA ΔC1935 en présence ou en absence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$	70
Figure 25.	Histogramme comparant le nombre de cellules fluorescentes mesurées en conditions témoin (HEK non transfectées) avec le nombre de cellules	

	fluorescentes transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1935}$ mesuré en présence et en absence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$	71
Figure 26.	Résultats d'une expérience de FACS montrant la fluorescence des cellules HEKT transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1856}$ en présence ou en absence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$	72
Figure 27.	Histogramme comparant le nombre de cellules fluorescentes mesurées en conditions témoin (HEK non transfectées) avec le nombre de cellules fluorescentes transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1856}$ mesuré en présence et en absence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$	73
Figure 28.	Résultats d'une expérience de FACS montrant la fluorescence des cellules HEKT transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1733}$ en présence ou en absence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$	75
Figure 29.	Histogramme comparant le nombre de cellules fluorescentes mesurées en conditions témoin (HEK non transfectées) avec le nombre de cellules fluorescentes transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1733}$ mesuré en présence et en absence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$	76

LISTES DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

-A-

ABP : « Alpha Binding Pocket »
ADN : Acide désoxyribonucléique
AID : « Alpha Interaction Domain »
AKAP15 : « A-kinase anchor proteins »
AMP : « Adénosine Mono-Phosphate »
ARN : Acide ribonucléique

-B-

BSA : « Bovine Serum Albumin »
BTZ : Benzothiazépine

-C-

CED : « C-terminal Essential Determinant »
CDI : « Calcium Dependant Inactivation »

-D-

DAG : Diacylglycérol
DHP : Dihydropyridines

-E-

E : Glutamate (Glu)
ECL : « Enhanced Chemiluminescent »

-F-

FACS : « Fluorescence Activated Cell Sorting »
FI : « Fluorescence Intensity »
FITC : « Fluoresceine Iso Thio Cyanate »
FSC : « forward light scatter »

-G-

GK : « Guanylate Kinase »

-H-

HEKT : « Human Embryonic Kidney T »
HA : « Human influenza hemagglutinin »
HRP : « Horseradish Peroxydase »
HVA : « High Voltage Activated »

-I-

IP₃ : « Inositol-1,4,5-triphosphate »
IP₃R : « Récepteur à l'inositol-1,4,5-triphosphate »

-K-

KCLM : « Kinases des chaînes légères de myosine »

-L-

LVA : « Low Voltage Activated »

LRET : « Leuthanide-based Resonance Energy Transfer »

-M-

MTS : Methanethiosulfonate

-N-NCX : « Echangeur $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ »

NK : « Nucleotide Kinase »

-P-

PCLM : Phosphatase des chaînes de myosine

PMCA : « Plasma Membrane Calcium ATPase »

PAA : Phénylalkylamines

PKC : « Protéine Kinase Calcium Dépendante »

PKA : « Protéine Kinase AMP cyclique dépendante »

PPIIA : « Protéine phosphatase II A »

PBS : « Phosphate Buffer Saline »

PBS-CM : « Phosphate Buffer Saline Calcium Magnésium »

PVP : Proline Valine Proline

-R-

ROC : « Receptor Operated Channel »

RyR : « Ryanodine Receptor »

R : Arginine

-S-

STIM1 : « Stromal Interacting Molecule 1 »

SDS-PAGE : « Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis »

SSC : « Side Scatter »

SOC : « Store-Operated Channel »

SERCA : « Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase »

SH3 : « Src Homology-3 »

-T-

TRP : « Transient Receptor Potential »

-V-

VDCC : Canaux calciques dépendants du voltage

VDI : « Voltage Dependant Inactivation »

 $V_{0,5,act}$: Potentiel de mi-activation $V_{0,5,inact}$: Potentiel de mi-inactivation**-W-**

W : Tryptophane

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Dr Lucie Parent de m'avoir accueilli dans son laboratoire durant les deux ans de maîtrise que j'ai passés à Montréal. L'expérience que j'ai vécue au laboratoire, les interactions que j'ai eues avec le Dr Lucie Parent ainsi qu'avec les autres membres du laboratoire ont contribué à mon évolution scientifique, à mon esprit d'analyse, mais aussi à développer ma personnalité grâce à un environnement des plus agréables. Les critiques, les corrections multiples et les interactions que j'ai eues avec le Dr Lucie Parent mais aussi avec le Dr Benoîte Bourdin lors de la correction du mémoire m'ont beaucoup apporté et j'aimerais exprimer toute ma gratitude aux nombreuses heures que ces deux personnes m'ont consacré.

Je voudrais aussi remercier Alexandra Raybaud (agente de recherche du laboratoire du Dr Lucie Parent) pour m'avoir appris toutes les techniques du laboratoire, qu'il s'agisse aussi bien de la biologie moléculaire, de la biologie des protéines mais aussi des techniques électrophysiologiques. Je la remercie pour sa patience de m'avoir formé et d'avoir partagé son énergie et sa bonne humeur et aussi d'avoir effectué les expériences préliminaires de mon projet. La recherche étant aussi faite d'échange et de partage avec les autres membres du laboratoire, je voudrais donc aussi témoigner ma reconnaissance aux autres membres du laboratoire, le Dr Benoîte Bourdin, Sébastien Wall-Lacelle et Yolaine Dodier.

Je souhaiterais aussi remercier tous les membres du GEPROM pour leur gentillesse et leur appui. Chaque personne m'a toujours donné de l'aide et du soutien lorsque j'en ai eu besoin. En particulier, Julie Verner, pour m'avoir appris les techniques pratiquées en salle de culture mais aussi Hélène Klein d'avoir toujours été présente pour répondre à mes questions en biologie moléculaire et aussi d'avoir sous-cloné Ca α 1.2 dans le vecteur pCMV-Tag5. Je voudrais aussi souligner l'aide de M. Serge Sénéchal, responsable de la manipulation de l'appareil de FACS, mais aussi le Dr Benoîte Bourdin pour avoir mis au point la technique de FACS dans notre laboratoire. J'aimerais aussi témoigner ma reconnaissance aux membres du jury, les docteurs Audrey Claing et Céline Fiset, pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Enfin, je voudrais remercier ma famille, qui malgré la distance, m'ont toujours soutenu durant mon séjour au Québec. Aussi, j'aimerais remercier ma meilleure amie, Marjorie Larcelet, qui a toujours su comment me remonter le moral dans les moments difficiles, de même que Corentin Lelong. Il en va de même de mes amis français, québécois et japonais avec lesquelles j'ai passé des moments inoubliables, et qui ont fait de mon expérience au Québec une expérience extraordinaire qui se répercutera dans ma vie future à la fois au niveau personnel et professionnel.

1. INTRODUCTION

Le calcium est un ion indispensable pour le bon fonctionnement de l'organisme humain ainsi que pour d'autres vertébrés vivant sur Terre. Dans le cas du corps humain, l'ion calcium joue différents rôles physiologiques. La majorité du calcium dans le corps (soit 99%) se trouve dans les os et dans les dents et le 1% restant joue un rôle important dans des réactions physiologiques comme le couplage excitation-contraction au niveau des muscles cardiaques, lisses ou squelettiques, mais aussi dans les phénomènes d'exocytose des cellules sécrétrices. D'une manière tout aussi importante, il joue le rôle de messenger intracellulaire en permettant l'activation de protéines qui vont elles-mêmes activer différentes voies de signalisation.

Le gradient de concentration ionique de part et d'autre de la membrane plasmique est très élevé en ce qui concerne le calcium. La concentration de calcium libre intracellulaire est de 10^{-4} mM alors que pour le milieu extracellulaire, celle-ci se situe entre 1 et 2 mM. (Dong, Saikumar et al. 2006)

Nous nous consacrerons à étudier les phénomènes physiologiques que nous observons au niveau du muscle cardiaque. En effet, le canal calcique $Ca_v1.2$, protéine à laquelle nous nous intéresserons, est situé principalement au niveau du cœur et une mutation ou un agent inhibiteur appliqué à ce canal, provoque très souvent des désordres de la fonction cardiaque.

1.1 Le calcium intracellulaire et son rôle dans le couplage excitation-contraction musculaire

Afin que le calcium puisse jouer ses rôles physiologiques, la concentration de cet ion doit fluctuer de manière périodique. Si la concentration de calcium intracellulaire devient trop importante pendant une période de temps trop longue, ceci devient létal pour la cellule. Ainsi, différents mécanismes ont été développés par la cellule afin de contrôler la concentration de calcium intracellulaire. Cette dernière pourra alors être maintenue basse pour permettre la survie de la cellule mais elle pourra aussi fluctuer de manière périodique pour contrôler les processus physiologiques dans lesquels le calcium intervient.

Les concentrations intracellulaires de calcium peuvent augmenter de deux manières différentes :

- soit le calcium extracellulaire peut entrer via différents canaux calciques situés à la membrane plasmique,
- soit il peut être libéré à partir du réticulum sarcoplasmique dont la concentration intraréticulaire est d'environ 100 μM (Shannon, Ginsburg et al. 2000).

La libération des ions calcium est permise grâce à des canaux récepteurs : les récepteurs à la ryanodine (RyR) (réticulum sarcoplasmique) ou les récepteurs à (IP_3R) (réticulum sarcoplasmique et endoplasmique) (Jurkovicova, Sedlakova et al. 2008). La concentration intracellulaire locale augmente transitoirement à 600 nM pour que le couplage excitation-contraction puisse s'effectuer (Bers 2002).

Le calcium, pour permettre la contraction du muscle, va se fixer sur la troponine C qui se trouve au niveau des sarcomères musculaires. Dès lors, un changement de conformation du complexe protéique va découvrir le site d'interaction entre l'actine et la tête de la myosine et ainsi permettre la contraction musculaire (Sun, Lou et al. 2009).

On retrouve ce phénomène au niveau des cellules musculaires cardiaques et musculaires squelettiques. Dans le cas du muscle lisse, la contraction s'effectue d'une autre manière (il n'existe pas de troponine dans cet organe). Aussi, le couplage excitation-contraction est initié par une augmentation transitoire des ions calcium, mais cette augmentation sert plutôt à activer la calmoduline qui va elle-même activer la kinase des chaînes légères de myosine (KCLM) et ainsi découvrir le site d'interaction entre l'actine et la myosine par changement de conformation.

Dans le cas du muscle cardiaque et squelettique, le calcium libéré est ensuite repompé dans le réticulum afin de servir à nouveau. La protéine impliquée dans ce processus est la pompe SERCA (« Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase ») (Berridge, Bootman et al. 2003).

Dans le cas du muscle lisse, c'est l'activité de la phosphatase des chaînes légères de myosine (PCLM) qui prend le dessus puisque la KCLM n'est plus active à cause de la baisse de concentration du calcium intracellulaire, il y a alors relaxation. Dans cet organe, le calcium est repompé vers le milieu extracellulaire par la pompe PMCA (Plasma Membrane Calcium ATPase). Le réticulum endoplasmique est bien moins développé et joue un rôle moindre dans l'homéostasie calcique de la cellule musculaire lisse (El-Yazbi, Cho et al. 2008).

Le maintien de l'homéostasie calcique est aussi assuré par l'échangeur $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) et la pompe PCMA (« plasma membrane Ca^{2+} -ATPase ») au niveau de la membrane plasmique (Berridge, Bootman et al. 2003). Ces deux types de protéines sont retrouvés à la fois au niveau du muscle lisse et du muscle squelettique.

1.1.1 Entrée du calcium via les canaux de la membrane plasmique

Il existe quatre types de canaux qui permettent l'entrée d'ions calcium à l'intérieur de la cellule : les canaux calciques dépendants du voltage (VDCC), les canaux TRP (« Transient Receptor Potential »), les canaux de type ROC (« Receptor Operated Channel ») et les canaux de type SOC (« Store Operated Channel ») (Berridge 1997).

Ces canaux se retrouvent au niveau des cellules excitables. Ces cellules jouent un rôle très important dans la physiologie du corps humain. Nous pouvons citer, parmi eux, la libération d'hormones et de neurotransmetteurs mais aussi la propagation de l'influx nerveux. Ces cellules sont appelées excitables parce que leur potentiel de membrane, dans certaines conditions (ex : fixation d'un ligand à un récepteur ou encore propagation de l'influx électrique neuronal), peut varier transitoirement d'un potentiel de repos se situant autour de -70 mV, (potentiel d'équilibre de Nernst des ions potassium) jusqu'à une valeur proche du potentiel d'équilibre de Nernst des ions sodium (l'équation et l'explication du potentiel de Nernst sont précisées à la section 1.2.2).

1.1.1.1 Les canaux calciques de type VDCC

La première classification des canaux calciques était fondée sur leurs propriétés biophysiques. En effet, les groupes d'Ozawa en 1975 et de Yarom en 1981 ont constaté que certains canaux calciques avaient besoin d'une forte dépolarisation ($\approx +30$ à $+50$ mV) pour s'ouvrir alors que d'autres ne requéraient qu'une faible dépolarisation ($\approx +10$ à $+20$ mV) (Hagiwara, Ozawa et al. 1975) (Llinas and Yarom 1981).

Deux familles ont alors été établies en 1986 (Mitra and Morad 1986):

- la famille des canaux activés par une faible dépolarisation (Low-Voltage-Activated (LVA))
- la famille des canaux activés par une forte dépolarisation (High-Voltage-Activated (HVA))

Les canaux de type LVA s'activent à un voltage membranaire d'environ -45 mV. Ces canaux ont été appelés canaux calciques de type T (T pour Tiny et Transient).

Les canaux HVA quant à eux, s'activent à des voltages compris entre -14 et $+9,5$ mV. Ils ont été nommés canaux calciques de type L (L pour Large et Long-Lasting) (Catterall, Perez-Reyes et al. 2005).

Dans les années 1980, d'autres canaux ont été identifiés dont les propriétés ne correspondaient pas à cette classification. C'est ainsi que sont apparus les canaux de type P/Q, les canaux de type N et les canaux de type R, que l'on retrouve au niveau des neurones (Nowycky, Fox et al. 1985; Fox, Nowycky et al. 1987).

Au milieu des années 1990, la nomenclature des canaux calciques a été révisée à la lumière des résultats de clonage obtenus par les groupes de Snutch et Birnbaumer. En effet, les expériences révélèrent que les canaux calciques sont en réalité composés de trois à quatre sous-unités. La sous-unité principale est appelée $\text{Ca}_v\alpha 1$ et elle est accompagnée de trois autres sous-unités auxiliaires, les sous-unités $\text{Ca}_v\beta$, $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$ et $\text{Ca}_v\gamma$.

$\text{Ca}_v\alpha 1$ forme le pore du canal et elle détermine les propriétés biophysiques et pharmacologiques du canal. Les sous-unités auxiliaires modulent l'activité de la sous-unité principale (sous-familles Ca_v1 et Ca_v2). De plus, chaque sous-unité possède différentes isoformes. Cette nouvelle nomenclature tiens compte à la fois de la structure primaire et de la structure quaternaire des canaux calciques.

On obtient la classification suivante :

- Type L : $\alpha 1S$, $\alpha 1C$, $\alpha 1D$ et $\alpha 1F$
- Type P/Q : $\alpha 1A$
- Type N : $\alpha 1B$
- Type R : $\alpha 1E$
- Type T : $\alpha 1G$, $\alpha 1H$ et $\alpha 1I$

(Snutch, Leonard et al. 1990; Birnbaumer, Campbell et al. 1994)

Finalement, la nomenclature couramment utilisée a été acceptée par l'ensemble de la communauté scientifique en tenant compte des modèles précédemment utilisés pour les canaux potassiques. On obtient une appellation du type $Ca_v x.y$ où x est le nombre désignant la famille Ca_v de canal et y est le nombre désignant les membres d'une famille. Dès lors, les canaux de type L sont rangés dans la famille Ca_v1 , les canaux P, Q, N et R dans la famille Ca_v2 et les canaux de type LVA (ou T) sont classés dans la famille Ca_v3 (Ertel, Campbell et al. 2000; Lacinova 2005) (Tableau1).

1.1.1.1.1. Les canaux calciques de type HVA

Les canaux HVA regroupent les familles Ca_v1 et Ca_v2 . Ces canaux sont activés par une forte dépolarisation membranaire (canaux calciques de type HVA). Cependant, les cinétiques d'activation et d'inactivation des canaux peuvent varier significativement (Tableau 2). En effet, l'ion physiologique pour ces canaux est le calcium, mais d'autres cations **divalents** peuvent diffuser à travers le pore du canal. Il est possible d'observer des courants en présence de barium mais aussi en présence de strontium (Yoshii, Tsunoo et al. 1988). Cependant, la conductance unitaire des canaux en barium est différente de celle observée en présence de calcium dans le cas de la sous-famille Ca_v1 . Les différences de conductances unitaires sont moins prononcées pour les sous-familles Ca_v2 et Ca_v3 .

De plus, ces deux familles ont aussi une distribution cellulaire différente et elles ne sont pas sensibles aux mêmes agents pharmacologiques (Tableaux 1 et 2).

Les canaux calciques de type Ca_v1 ou de type L

Les canaux Ca_v1 jouent un rôle dans le couplage excitation-contraction ($Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$), la libération d'hormones ($Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$), la régulation de la transcription ($Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$) et l'intégration synaptique ($Ca_v1.2$). Ils interviennent aussi dans le rythme cardiaque ($Ca_v1.3$), la perception de l'ouïe ($Ca_v1.3$), la libération de neurotransmetteurs par les cellules sensibles ($Ca_v1.3$) et les cellules photoréceptrices ($Ca_v1.4$).

Leur cinétique d'inactivation en barium est relativement lente ($\Gamma_{inac} < 500$ ms) et la conduction du canal est deux fois plus grande en présence d'ions barium qu'en présence d'ions calcium, lorsqu'enregistré aux mêmes concentrations.

Leur distribution tissulaire est ubiquitaire et ils sont sensibles aux composés pharmacologiques suivants : les dihydropyridines (DHP), les phénylalkamines (PAA) et les benzothiazépines (BTZ). Le tableau 1 présente un ordre de grandeur de l'IC₅₀ de ces 3 composés. La sensibilité à ces composés varie selon le type de sous-unité Ca_v1. La sous-unité Ca_v1.4 est cependant moins sensible aux inhibiteurs et nécessite de plus fortes doses de ces derniers pour atteindre l'IC₅₀. On utilise souvent ces composés pour le traitement de l'hypertension cardiaque et de l'angine de poitrine.

Ces composés ont principalement deux propriétés :

- un effet dromotrope négatif ce qui signifie qu'ils diminuent la conduction entre les oreillettes et les ventricules,
- un effet bathmotrope négatif, c'est-à-dire qu'ils diminuent l'excitabilité des cellules au niveau sinusal) (Huber, Wappl et al. 2000; Catterall, Perez-Reyes et al. 2005).

Les canaux calciques Ca_v2

Les canaux Ca_v2 sont situés principalement au niveau du système nerveux. Ils sont retrouvés dans les terminaisons nerveuses, les dendrites et les cellules neuroendocrines dans le cas de Ca_v2.1 et Ca_v2.2, alors que Ca_v2.3 se trouve en grande majorité dans les corps cellulaires et les dendrites des neurones. Ils interviennent dans le contrôle de la libération des neurotransmetteurs ou des hormones.

Leur constante d'inactivation en présence d'ions barium est plus rapide que celle des canaux de type L : de l'ordre de 50 à 80 ms (alors qu'elle est inférieure à 500 ms pour les canaux de type L) et les conductances unitaires en barium et en calcium sont égales dans les mêmes conditions expérimentales (Tableau 2).

Dans cette famille de canaux, les inhibiteurs sont spécifiques du type de canal. Ainsi Ca_v2.1 est inhibé par la ω -Agatoxine IVA (toxine issue de l'araignée *Agelenopsis aperta*) (IC₅₀ = 20nM) (Mintz, Venema et al. 1992). Les canaux calciques de type P et les canaux calciques de type Q sont encodés par la même sous-unité principale Ca_v α 1 (Ca_v2.1) mais c'est la nature de la sous-unité auxiliaire qui modifie les propriétés biophysiques et qui permet ainsi de les classer dans le type P ou Q (Moreno, Rudy et al. 1997). De plus, il semblerait que les canaux de type P soient plus sensibles à la toxine que les canaux de type Q (Llinas, Sugimori et al. 1989).

Ca_v2.2 est inhibé par la ω -conotoxine-GVIA issue de l'escargot *Conus geographus* (Yarotsky and Elmslie 2009). Ca_v2.3 est inhibé par le SNX-482, issue de la tarentule *Hysterocrates gigas* (Newcomb, Szoke et al. 1998) qui inhibe les courants avec un IC₅₀ de 1 μ M (McNaughton, Davies et al. 2004) en déplaçant le potentiel de mi-activation de +70mV (Bourinet, Stotz et al. 2001). Cela empêche l'activation du canal à des voltages dépolarisants physiologiques.

1.1.1.1.2 Les canaux calciques de type LVA (canaux Ca_v3)

Ces canaux sont insensibles aux composés de la famille dihydropyridines (DHP) qui inhibent les canaux Ca_v1 ainsi qu'aux toxines qui inhibent les canaux Ca_v2. Aucun agent pharmacologique inhibant spécifiquement ce type de canal n'a été identifié jusqu'à présent (Catterall, Perez-Reyes et al. 2005). Cependant, en 2009, le groupe d'Edward Perez-Reyes a testé, sur le canal recombinant Ca_v3.2, différents antihypertenseurs utilisés en clinique (dérivés des dihydropyridines).

Ils ont ainsi regroupé trois grandes classes :

- les inhibiteurs avec haute affinité (IC₅₀ située entre 1 et 3 μ M), tels que l'éfonidipine, l'isradipine et la nifédipine,
- les inhibiteurs avec moyenne affinité (IC₅₀ située entre 5 et 10 μ M) tels que la fêlodipine, la nimodipine, la Nisoldipine et la Nitrendipine,
- les inhibiteurs avec faible affinité, dont l'IC₅₀ se situe entre 20 et 30 μ M, sont l'amplodipine, le Bay K8644 et la nifédipine. (Perez-Reyes, Van Deusen et al. 2009)

Les canaux de type LVA sont caractérisés par une zone d'activation qui se situe autour de -45 mV ce qui est bien plus négatif que celui des canaux de type HVA (Lacinova 2005). Leurs cinétiques d'inactivation sont les plus rapides de tous les VDCC que ce soit en présence de barium ou de calcium (\approx 16 à 70ms) (Catterall, Perez-Reyes et al. 2005).

Zone d'activation ⁽¹⁾	Classification fonctionnelle ⁽²⁾	Canal ^(3,4)	Sous-unité $\alpha 1$ ⁽⁵⁾	Localisation tissulaire ⁽¹⁾	Inhibiteurs ⁽¹⁾
HVA	L	Ca _v 1.1	$\alpha 1S$	Muscle squelettique, tubules transverses	Dihydropyridines (DHP) Phénylalkylamines (PAA) Benzothiazépines (BTZ) (IC ₅₀ < 50 nM et pour Cav1.4 : IC ₅₀ < 300 nM)
		Ca _v 1.2	$\alpha 1C$	Myocytes cardiaques, muscle lisse, cellules endocrines, corps cellulaires et dendrites des neurones	
		Ca _v 1.3	$\alpha 1D$	Cellules endocrines, neurones, myocytes des oreillettes et du nœud sinusal, cellules de la cochlée	
		Ca _v 1.4	$\alpha 1F$	Cellules en bâton et les cellules bipolaires de la rétine	
	P/Q	Ca _v 2.1	$\alpha 1A$	Terminaisons nerveuses, dendrites et cellules endocrines	ω -agatoxine IVA (IC ₅₀ =1-3 nM (type P) et 100-200 nM pour le type Q)
	N	Ca _v 2.2	$\alpha 1B$		ω -conotoxine GVIA (IC ₅₀ = 1-2 μ M)
	R	Ca _v 2.3	$\alpha 1E$	Corps cellulaires et dendrites des neurones	SNX-482 (IC ₅₀ = 27 nM)
LVA	T	Ca _v 3.1	$\alpha 1G$	Corps cellulaires et dendrites des neurones et myocytes des muscles lisses	Mibefradil, U92032, Penfluridol, Pimozide (susceptibles d'inhiber de manière moindre les familles Ca _v 1 et Ca _v 2)
		Ca _v 3.2	$\alpha 1H$		
		Ca _v 3.3	$\alpha 1I$	Corps cellulaires et dendrites des neurones	

Tableau 1. Classification, localisation tissulaire, et propriétés pharmacologiques des canaux VDCC

Modifié de (Catterall, Perez-Reyes et al. 2005) ⁽¹⁾ (Mitra and Morad 1986) ⁽²⁾ (Tsien, Lipscombe et al. 1988) ^(3,4) (Snutch, Leonard et al. 1990; Birnbaumer, Campbell et al. 1994) ⁽⁵⁾

Zone d'activation	Classification fonctionnelle	Canal	Zone d'activation (15mM Ba ²⁺)	Constante d'inactivation en Barium	Conductance relative
HVA	L	Ca _v 1.1	De -14 à -2,5 mV	>500 ms	Ba ²⁺ > Ca ²⁺
		Ca _v 1.2			
		Ca _v 1.3			
		Ca _v 1.4			
	P/Q	Ca _v 2.1	De 3,5 à 9,5 mV	≈ 50 à 80 ms	Ba ²⁺ = Ca ²⁺
	N	Ca _v 2.2			
	R	Ca _v 2.3			
LVA	T	Ca _v 3.1	De -46 à -44 mV	≈ 20 à 50 ms	Ba ²⁺ = Ca ²⁺
		Ca _v 3.2			
		Ca _v 3.3			

Tableau 2. Propriétés biophysiques des canaux VDCC

(Ertel, Campbell et al. 2000; Yamakage and Namiki 2002; Catterall, Perez-Reyes et al. 2005)

1.1.1.2 Les canaux calciques TRP

Les gènes qui expriment les protéines TRP (« Transient Receptor Potential ») sont à ce jour au nombre de 26 et ils codent pour diverses canaux cationiques. Ces canaux sont perméables à la fois aux cations mono et divalents, à l'exception des canaux TRPM4/5 qui sont sélectifs aux ions monovalents et TRPV5/6 sélectifs aux ions calcium.

Le rôle physiologique des différents canaux TRP commencent à émerger. En effet, certains canaux TRP peuvent générer des courants SOC et ROC (voir section 1.1.2 et 1.1.4). Il existe six sous-familles : les sous familles TRPC (C pour Canonique ou classique), TRPV (V pour Vanilloïde), TRPM (M pour Mélastatine), TRPP (P pour PKD), TRPML (ML pour mucolipines) et TRPA (A pour ANKTM1). Les gènes TRP varient selon l'organisation de leurs introns et exons avec une très grande diversité concernant la sous famille TRPP. Les noms des membres d'une sous-famille découlent de cette organisation. Ainsi TRPV3 suit TRPV1 et TRPV6 suit TRPV5 sur le gène. Ce sont des répliques de gène (Vennekens, Voets et al. 2002; Birnbaumer, Yildirim et al. 2003; Clapham 2003).

Dans les deux parties suivantes, nous parlerons des canaux calciques de type ROC et SOC. Mais les canaux TRP font en réalité partie aussi de ces familles, car ils sont aussi susceptibles de générer des courants ROC et SOC. (Dietrich, Chubanov et al. 2006)

1.1.1.3 Les canaux calciques ROC

ROC signifie en anglais « Receptor Operated Channel », c'est-à-dire que ces canaux sont activés par des ligands extracellulaires. Il existe deux types de canaux activés de cette manière. La première consiste en la fixation du ligand directement sur le canal qui s'ouvre immédiatement. On appelle ces canaux-récepteurs, des récepteurs ionotropiques. Un exemple est le récepteur à l'acétylcholine au niveau de la membrane post-synaptique de la jonction neuro-musculaire. Une fois que l'acétylcholine vient se fixer, le canal s'ouvre et fait rentrer des ions sodium dans la cellule et cela provoque alors une dépolarisation locale qui aura pour effet d'ouvrir d'autres canaux.

L'autre cas, consiste en la fixation du ligand sur un récepteur indépendant du canal ionique en lui-même. Le complexe ligand-récepteur va induire une réponse intracellulaire dépendante des protéines G, la réponse finale sera l'ouverture du canal ionique. On appelle ces récepteurs, des récepteurs métabotropiques (Shapiro, Gomeza et al. 2001; Martyn, Fagerlund et al. 2009).

1.1.1.4 Les canaux SOC

SOC signifie en anglais « Store Operated Channel ». Ces canaux sont activés par les concentrations calciques intracellulaires. En effet, la vidange des réserves intracellulaires de calcium stimule l'entrée d'ions calcium. Ceci est possible grâce à la voie de signalisation faisant intervenir l'inositol 1,4,5 tri-phosphate (Bird, DeHaven et al. 2008). Selon une découverte récente du même groupe, l'AMP cyclique intervient aussi dans ce processus (Putney 2009).

Récemment, il a été suggéré que la protéine ORAI1 serait un canal de type SOC. Lorsque la concentration intracellulaire de calcium diminue la molécule STIM1 est activée par la voie de l'Inositol 1,4,5 triphosphate et permet alors d'interagir avec ORAI1 pour l'activer à son tour. Une découverte récente du groupe de Putney, STIM1, une fois activé, peut activer l'AMP cyclase et activer les voies dépendantes de l'AMP cyclique (Putney 2009).

Selon le groupe de Feske, c'est le domaine C-terminal de STIM1 qui se lie et qui active ORAI1. Ceci a été mis en évidence dans les cellules HEKT293 (Kawasaki, Lange et al. 2009).

1.2 Propriétés des canaux calciques dépendants du voltage (VDCC)

1.2.1 Propriétés structurales

Les canaux de type VDCC sont en réalité composés de quatre sous unités formant ainsi un complexe hétéro-oligomérique. La sous-unité principale est la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$. C'est une protéine transmembranaire importante et son poids peut varier de 190 à 250 kDa. C'est la sous-unité qui détermine la nature du canal, c'est-à-dire que c'est elle qui forme le pore, qui laisse passer les ions, qui possède le senseur du voltage et tout l'appareil de gating¹ permettant son ouverture et sa fermeture selon le voltage membranaire. Les sites d'affinité pour les drogues ainsi que les sites de régulation intracellulaires se trouvent aussi sur cette sous-unité. Les sous-unités $\text{Ca}_v\beta$ et $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$ sont des sous-unités auxiliaires. Elles possèdent dans le même cas que la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$ différents isomères. Elles jouent différents rôles et parmi eux un rôle dans l'expression du canal à la membrane, un rôle dans l'activation et l'inactivation ainsi qu'un rôle dans l'assemblage du canal. (Catterall, Perez-Reyes et al. 2005; Van Petegem and Minor 2006; Lin, Witschas et al. 2008) Ces sous-unités modulent les canaux Ca_v1 et Ca_v2 . Le rôle de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ est mieux connu que celui de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$. On trouve parfois une dernière sous-unité, $\text{Ca}_v\gamma$ qui a été jusqu'à ce jour identifiée seulement dans le muscle squelettique, $\text{Ca}_v1.1$. (Walker, Bichet et al. 1998) (Figure 1)

¹ Le terme anglais « gating » définit l'ensemble des mécanismes impliqués dans l'ouverture et la fermeture des canaux ioniques. Il n'existe pas de traduction précise de ce terme en français

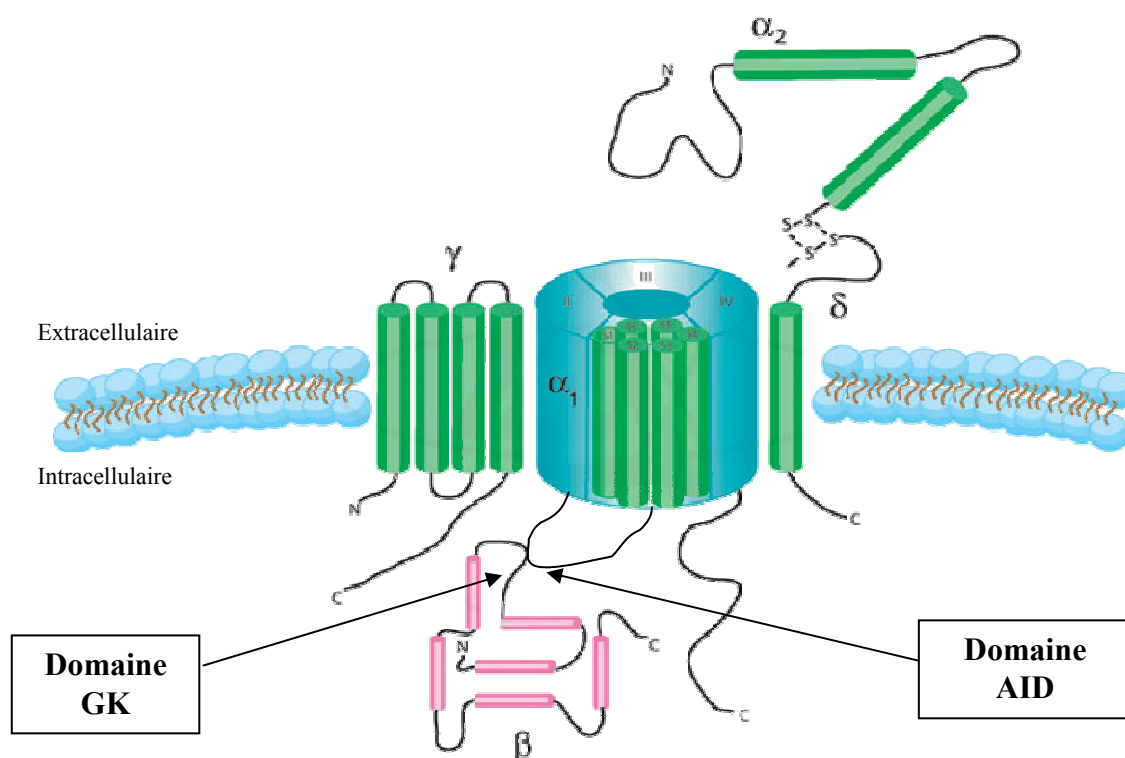


Figure 1. Structure tertiaire prédite des canaux calciques de la famille des VDCC. Cette figure montre le pore du canal formé par la sous-unité $Ca_v\alpha_1$. Cette dernière est composée de quatre domaines (Bleu) composés eux-mêmes de six segments transmembranaires (en vert). Les extrémités N et C terminales sont intracellulaires. On remarque aussi la sous-unité $Ca_v\beta$ (dont certains domaines sont indiqués en rose) et la sous-unité $Ca_v\alpha_2\delta$. La sous-unité $Ca_v\beta$, par l'intermédiaire de son domaine GK (Guanylate Kinase), interagit avec la sous-unité $Ca_v\alpha_1$ sur le domaine AID (Alpha Interaction Domain). La sous-unité $Ca_v\alpha_2\delta$ est composée de deux protéines reliées entre elle par un pont disulfure. On distingue alors une partie extracellulaire ($Ca_v\alpha_2$) et une partie transmembranaire ($Ca_v\delta$). Les rôles physiologiques de la sous-unité $Ca_v\gamma$ sont encore peu connus à ce jour mais on sait qu'elle est formée de quatre segments transmembranaires avec des extrémités N et C terminales intracellulaires.

Figure tirée du site de la compagnie Invitrogen.

1.2.1.1 La sous-unité principale $\text{Ca}_v\alpha 1$

La structure secondaire prédite de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$ est identique pour les sous-unités Ca_v1 , Ca_v2 , et Ca_v3 . La structure primaire diffère cependant.

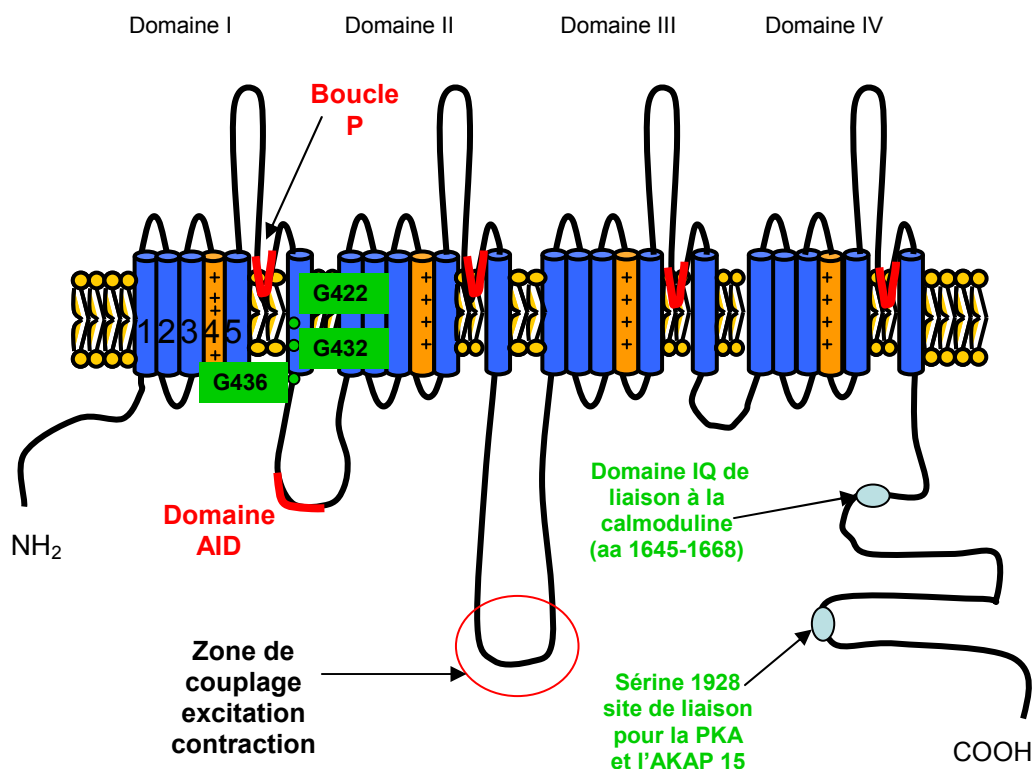


Figure 2. Structure secondaire prédite de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$ des VDCC. La sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$ qui forme le pore est formée de quatre domaines eux-mêmes formés de six segments transmembranaires (S1 à S6). Les extrémités N et C terminales sont cytoplasmiques. Différents aspects méritent d'être soulignés. Au niveau de la structure primaire, on remarque que trois glycines sont conservées dans tous les canaux de type HVA (en vert). Elles jouent un rôle dans le gating du canal, dans le cas de $\text{Ca}_v1.2$. En effet, dans le syndrome de Timothy, la mutation de ces glycines affectent grandement les cinétiques d'inactivation du canal. Au niveau de la structure secondaire, la boucle P (indiquée en rouge) forme le filtre de sélectivité du canal. Le site de liaison à la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ est porté par le domaine AID sur la boucle joignant les domaines I et II (dans le cas des sous-familles Ca_v1 et Ca_v2). Le site de liaison à la protéine canal RyR, dans le cas de $\text{Ca}_v1.1$ se trouve sur la boucle reliant les domaines II et III. Au niveau de la partie C-terminale du canal, on note un site de liaison à la calmoduline et à la PKA par l'intermédiaire de l'AKAP15 ($\text{Ca}_v1.2$). (Catterall, Perez-Reyes et al. 2005; Lacinova 2005; Raybaud, Dodier et al. 2006; Lian, Myatt et al. 2007)

Le segment S4 est appelé senseur du voltage, c'est-à-dire que ce segment change de conformation lors d'une dépolarisation membranaire ce qui entraîne l'ouverture du canal. Le segment S4 possède une série de résidus basiques (arginine ou lysine) qui s'alignent sur la face de l'hélice alpha. Le segment S4 se déplace dans le champ électrique membranaire pendant la dépolarisation. Dans une étude, les résidus chargés ont été modifiés par des résidus neutres ou d'autres chargés et ceci a induit un changement dans les cinétiques d'activation (Stuhmer, Conti et al. 1989; Auld, Goldin et al. 1990). Différents modèles existent quant au mouvement que fait l'hélice lorsque le voltage est appliqué. Voir section 2.2.1.1.

Les acides aminés du segment S6 tapissent la paroi interne du pore par où passent les ions calcium. La boucle reliant ces deux segments se replie dans la membrane et forme ce que l'on appelle la boucle P. Ainsi, les quatre boucles P des quatre domaines vont s'organiser et former le filtre de sélectivité. En 1995, le groupe de Gopalakrishnan, montre que quatre résidus sont importants pour la sélectivité au calcium. Il s'agit de quatre glutamates qui se suivent et que l'on appelle motif EEEE. Chaque glutamate se situe sur chaque boucle P et ainsi, en structure tertiaire, ces glutamates se retrouvent proches les uns des autres et créent ainsi un espace électronégatif dû aux résidus $-\text{COOH}$ de la chaîne latérale qui forme une bulle d'hydratation à l'intérieur du canal (Parent and Gopalakrishnan 1995). Cependant, d'autres ions divalents peuvent passer mais l'affinité pour le calcium est la plus forte ($K_d \approx 1 \mu\text{M}$). Des ions monovalents peuvent aussi traverser le canal à condition que le milieu soit totalement dépourvu d'ions divalents (Wu, Edwards et al. 2000; Cibulsky and Sather 2003). De plus, un alignement a été trouvé avec les canaux sodiques et l'on retrouve un motif qui forme le filtre de sélectivité et qui est dans ce cas DEKA (Tableau 3).

Sélectivité Ionique	Région « P » des domaines	Alignement de la séquence primaire				
Na⁺ (Na_v1.2)	Domaine I (398-402)	T	Q	D	Y	W
	Domaine II (753-757)	C	G	E	W	I
	Domaine III (1235-1239)	T	F	K	G	W
	Domaine IV (1527-1531)	T	S	A	G	W
Ca²⁺ (Ca_v1.1)	Domaine I (290-294)	T	M	E	G	W
	Domaine II (612-616)	T	G	E	D	W
	Domaine III (1012-1016)	T	F	E	G	W
	Domaine IV (1321-1325)	T	G	E	A	W

Tableau 3. Alignement des motifs DEKA et EEEE des canaux Na⁺ et Ca²⁺.
L'alignement des filtres de sélectivité du canal sodique Na_v1.2 et du canal calcique Ca_v1.1 est basé sur la conservation des tryptophanes (W). Tableau conçu à partir de données extraites de (Favre, Moczydlowski et al. 1996).

La boucle intracellulaire qui relie les domaines I et II dans les sous-unités Ca_vα1 des canaux Ca_v1 et Ca_v2, possède un domaine dit AID qui va permettre l'interaction avec la sous-unité Ca_vβ. Le domaine AID est composé d'une séquence de 18 acides aminés dont neuf sont conservés (Van Petegem, Duderstadt et al. 2008).

La séquence des sous-familles Ca_v1 et Ca_v2 est présentée dans la Figure 3. On peut donc déduire de cette figure la séquence universelle suivante :

QQXEXXLXGYXXWIXXE où X est un acide aminé quelconque.

L-type	Ca _v 1.1	QQLDEDLRGYMSWITQGE
	Ca _v 1.2	QQLEEDLKGyLDWITQAE
	Ca _v 1.3	QQLEEDLKGyLDWITQAE
	Ca _v 1.4	QQMEEDLRGYLDWITQAE
Non-L-type	Ca _v 2.1	QQIERELNGYMEWISKAE
	Ca _v 2.2	QQIERELNGYLEWIFKAE
	Ca _v 2.3	QQIERELNGYRAWIDKAE

Figure 3. Alignement des séquences du domaine AID de différents canaux Ca_v1 et Ca_v2.
(Van Petegem, Duderstadt et al. 2008)

La Figure 4 montre le pourcentage d'analogie entre les différentes sous-unités $Ca_v\alpha_1$ des canaux VDCC.

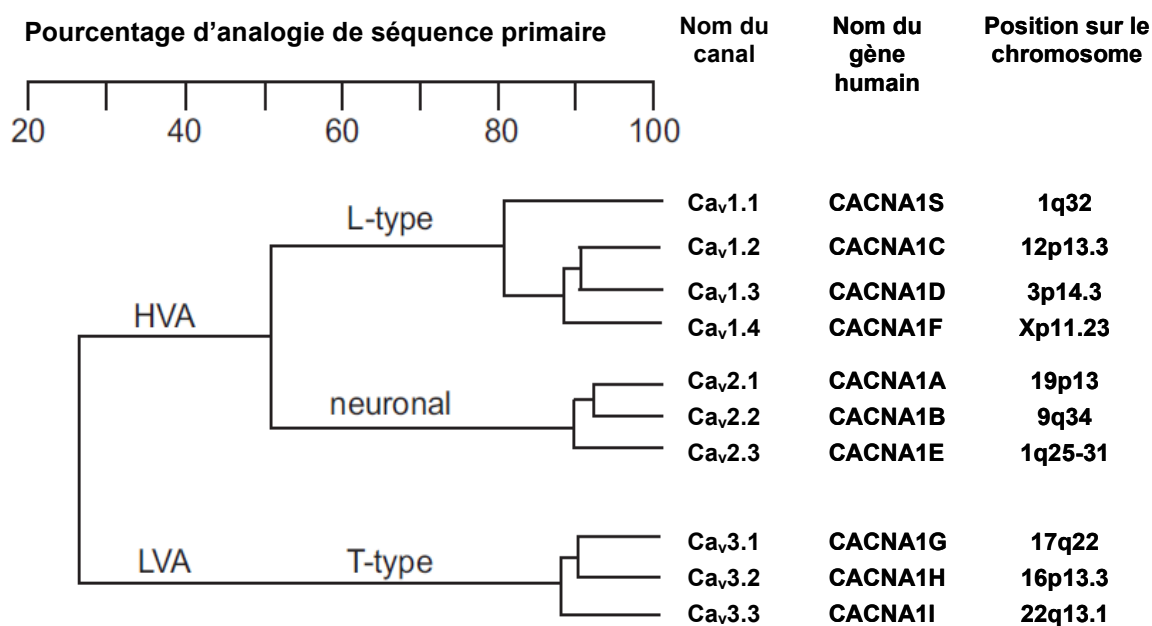


Figure 4. Homologie entre les trois sous-familles de canaux calciques Ca_v1 , Ca_v2 , Ca_v3 . Le pourcentage d'analogie de la séquence primaire, le nom du canal, le nom du gène correspondant et la position sur le chromosome sont indiqués (Catterall, Perez-Reyes et al. 2005; Lacinova 2005).

1.2.1.2 La sous-unité $Ca_v\beta$

La sous-unité $Ca_v\beta$ est une sous-unité intracellulaire des canaux calciques Ca_v . Il existe différents isoformes ($Ca_v\beta1$ à $Ca_v\beta4$) codés par différents gènes (Tableau 4). Le poids moléculaire des différents isoformes varie entre 52 et 78 kDa (Walker and De Waard 1998).

Isoforme de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$	Position sur le chromosome humain	Rôle physiologique	Localisation tissulaire
$\text{Ca}_v\beta 1$	17q21-22	Couplage excitation-contraction, expression membranaire de $\text{Ca}_v\alpha 1$, gating	Muscle squelettique pour $\text{Ca}_v\beta 1a$, cerveau pour les autres isoformes
$\text{Ca}_v\beta 2$	10p12	Gating, expression membranaire de $\text{Ca}_v\alpha 1$ et de $\text{Ca}_v 1.4$ dans la rétine	Cœur, poumons, trachée, aorte et cerveau
$\text{Ca}_v\beta 3$	12q13	Gating, expression membranaire $\text{Ca}_v\alpha 1$	Muscle lisse, trachée, aorte, poumons, cerveau
$\text{Ca}_v\beta 4$	2q22-23	Gating, expression membranaire de $\text{Ca}_v\alpha 1$	Cerveau

Tableau 4. Isoformes de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ connues jusqu'à présent, leur position sur le chromosome humain, leurs rôles physiologiques et leur localisation tissulaire. (Arikkath and Campbell 2003)

La sous-unité $\text{Ca}_v\beta 1$ a été la première sous-unité clonée à partir du muscle squelettique du lapin avec un poids moléculaire de 57,9 kDa. Ses isoformes issues de l'épissage alternatif sont $\text{Ca}_v\beta 1a$, $\text{Ca}_v\beta 1b$ et $\text{Ca}_v\beta 1c$ qui ont été identifiés, respectivement, dans le muscle squelettique, le cœur et les neurones. Cinq variants de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 2$ ont été découverts jusqu'à présent, il s'agit des sous-unités $\text{Ca}_v\beta 2a$, $\text{Ca}_v\beta 2b$, $\text{Ca}_v\beta 2c$, $\text{Ca}_v\beta 2d$ et $\text{Ca}_v\beta 2e$ (Herzig, Khan et al. 2007). La sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ a été clonée à partir du cœur de lapin par le groupe de Hullin en 1992 (Lacinova 2005).

1.2.1.2.1 Relation structure-fonction.

Trois sites de régulation ont été identifiés sur la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ (Figure 5).

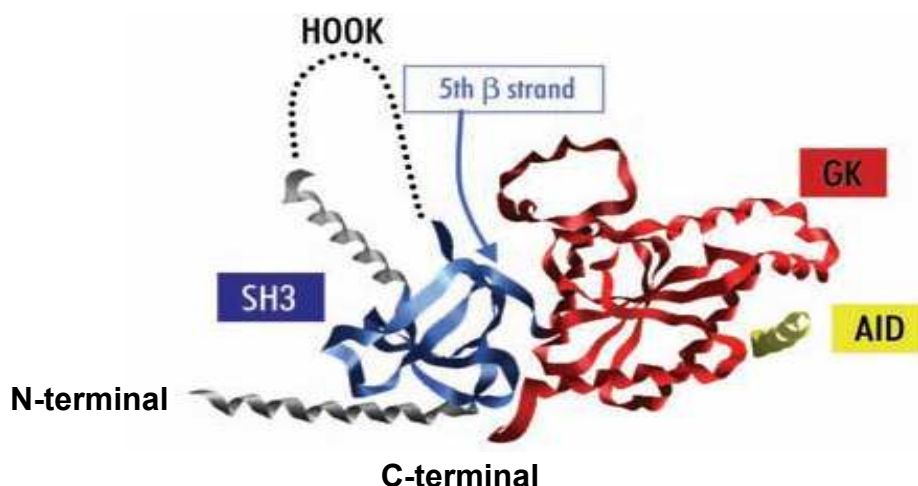


Figure 5. Structure tertiaire prédite de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 2a$. Modifié de (Richards, Leroy et al. 2007). La sous-unité a été cristallographiée par le groupe de Daniel Minor en 2004 (Van Petegem, Clark et al. 2004).

Le domaine SH3 (« Src Homology 3 ») se retrouve du côté de l'extrémité N-terminale. Il a été suggéré qu'il interagisse avec le domaine GK pour orienter le domaine HOOK de façon optimale avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$ (Richards, Leroy et al. 2007). Une autre hypothèse veut que le domaine SH3 interagisse aussi directement avec le domaine AID de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$ mais avec une faible affinité par rapport au domaine ABP (Alpha Binding Pocket) (Maltez, Nunziato et al. 2005).

Vient ensuite le domaine HOOK. C'est un domaine Variable, appelé V2, qui pourrait jouer un rôle dans la modulation des cinétiques d'inactivation (Richards, Leroy et al. 2007). De plus, en 2009, le groupe de Dolphin a prouvé dans le cas du canal $\text{Ca}_v2.2$ que la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 2a$ perdait sa fonction normale si le domaine HOOK était supprimé de même qu'une partie du domaine SH3 (Dresviannikov, Page et al. 2009).

Le domaine GK (« Guanylate Kinase ») ou NK (« Nucléotide Kinase ») se situe au niveau du C-terminal et il est un domaine d'interaction avec le nucléotide GMP. Il possède aussi le site d'interaction avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$. Il semblerait selon des études récentes que le dimère $\beta\gamma$ (provenant de la dissociation des protéines G trimériques $\alpha\beta\gamma$) puisse interagir et réguler les cinétiques d'inactivation à cet endroit en permettant une interaction entre le segment S6 du domaine I et le AID. Ceci affecte par conséquent l'inactivation dépendante du voltage (Zhang, Chen et al. 2008).

Le domaine d'interaction de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$ est appelé ABP pour Alpha Binding Pocket. Cette nomenclature a été proposée par Catterall lorsque son laboratoire a cristallisé l'interaction entre les deux sous-unités. Ce domaine forme une conformation telle qu'il s'emboîte parfaitement avec le domaine AID de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$ du canal (Figure 6).

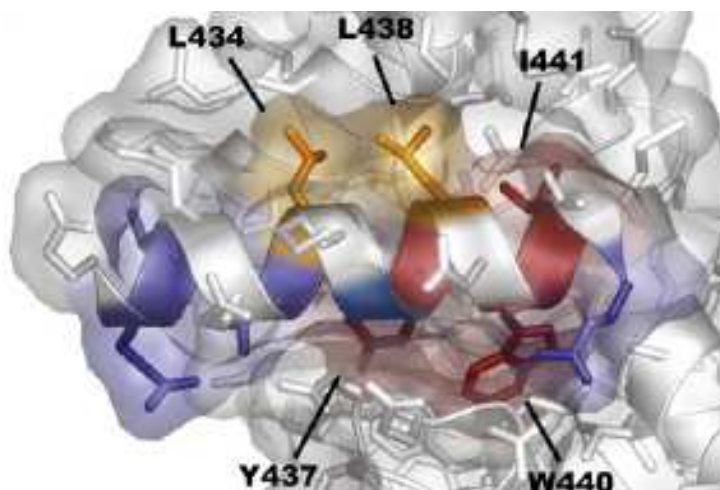


Figure 6. Structure cristallographique de l'interaction entre le AID de la sous-unité $\text{Ca}_v1.2$ et l'ABP de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 2a$. Les résidus susceptibles de jouer un rôle indispensable dans l'interaction sont indiqués sur la figure (Van Petegem, Duderstadt et al. 2008).

Des analyses de mutagenèse dirigée ont montré que trois résidus (Tyrosine, Tryptophane et Isoleucine) étaient importants pour la liaison et l'interaction avec la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ (Walker and De Waard 1998). Plus tard, seul le résidu tryptophane (W) fut montré comme le véritable résidu indispensable (Figure 3). Des mutations hydrophobes, hydrophiles ou aromatiques de ce résidu sur le canal $\text{Ca}_v2.3$ empêchent la liaison avec $\text{Ca}_v\beta 3$ (Berrou, Klein et al. 2002) (voir aussi partie 1.2.2.2.1).

Les protéines $\text{Ca}_v\beta$ jouent aussi un rôle dans l'expression à la membrane de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$. L'hypothèse présente avancée est qu'il existerait un site de rétention au niveau du réticulum endoplasmique dans la région du site AID. Ainsi, lorsque la sous-unité arrive, cette dernière se fixe au niveau du site AID et cache le site de rétention, ce qui permet au canal d'être amené à la membrane.

Cependant, le groupe de Bichet a montré ceci, en n'utilisant uniquement que la protéine CD8 auquel le domaine I-II a été ajouté et la construction fut marquée à l'aide d'un fluorophore. Le reste de la sous-unité $\text{Ca}_v1.2$ est donc absent. En effectuant différentes délétions au niveau de la boucle I-II en absence de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta3$, ils ont pu montrer que le CD8 était exprimé à la membrane plasmique. Ceci est critiquable étant donné que la protéine $\text{Ca}_v\alpha1$ est de haut poids moléculaire et d'autres parties de la protéine peuvent sûrement intervenir au niveau de l'interaction entre la boucle I-II et la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$. De plus, il est fort probable, dans ces conditions, que la structure originale de la boucle I-II soit altérée (Brice, Berrow et al. 1997; Bichet, Cornet et al. 2000; Cornet, Bichet et al. 2002).

D'autres interactions semblent être possibles au niveau de l'AID de $\text{Ca}_v\alpha1$. En effet, il est proposé que le domaine SH3 puisse aussi interagir avec le AID. Ceci a été prouvé en présence de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta2a$ et le canal $\text{Ca}_v2.2$ (Richards, Leroy et al. 2007). Aussi, le groupe de Nikolai. M. Soldatov propose que la sous-unité $\text{Ca}_v\beta2$ possède un domaine de liaison, CED, unique à cette sous-unité soit, par l'intermédiaire du domaine SH3, soit par l'intermédiaire du C-terminal de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$. Cette interaction n'apparaît que lorsque l'interaction GK-AID est éliminée (Lao, Kobrinsky et al. 2008). Une interaction entre le domaine AID et l'extrémité N-terminale a aussi été suggérée en 2007. En effet, l'épissage alternatif peut affecter cette région. Ce dernier est alors susceptible de modifier la régulation par les sous-unités $\text{Ca}_v\beta$, c'est-à-dire à la fois moduler les cinétiques d'inactivation mais aussi moduler l'accrochage aux radeaux-lipides (régions de la membrane plasmique riches en cholestérol et sphingolipides). Le groupe de Liu propose que le N-terminal possède des sites de palmitoylation qui faciliterait leur ancrage à ces lipides particuliers. Cependant, le taux général d'expression à la membrane ne semble pas être affecté (Cheng, Liu et al. 2007).

1.2.1.3. La sous-unité $\text{Ca}_v\alpha2\delta$

La sous-unité $\text{Ca}_v\alpha2\delta$ est une protéine fortement glycosylée qui est issue de la liaison de deux protéines $\text{Ca}_v\alpha2$ et $\text{Ca}_v\delta$ par un pont disulfure. Ces deux protéines sont issues de l'épissage alternatif d'un même gène (Randall and Benham 1999). La pro-protéine synthétisée au niveau de réticulum est clivée et les deux parties se rejoignent ensuite en formant le pont disulfure (Klugbauer, Lacinova et al. 1999).

La protéine $Ca_v\alpha 2$ est extracellulaire et contient l'extrémité N-terminale de la protéine alors que $Ca_v\delta$ est une protéine transmembranaire avec un seul segment transmembranaire au bout duquel se retrouve l'extrémité C-terminale.

La première des quatre isoformes connus à ce jour de la sous-unité $Ca_v\alpha 2\delta$ à avoir été clonée avait un poids moléculaire de 125 kDa et fut clonée en 1988 par le groupe d'Ellis (Ellis, Williams et al. 1988; Lacinova 2005) (figure1) (Tableau 5).

Isoforme de la sous-unité $Ca_v\alpha 2\delta$	Position sur le chromosome humain	Poids moléculaire (kDa)	Rôle	Localisation tissulaire
$Ca_v\alpha 2\delta$-1	7q21-22	140	Expression membranaire de $Ca_v\alpha 1$, accroît l'amplitude des courants, accélère les cinétiques d'activation et d'inactivation	cerveau, cœur, muscle squelettique
$Ca_v\alpha 2\delta$-2	3p21.3	138	Accroît l'amplitude des courants	Poumons, testicules, cerveau, cœur, pancréas, prostate, muscle squelettique, moelle épinière
$Ca_v\alpha 2\delta$-3	3p21.1	131	Accroît les densités de courants, activation dépendante du voltage, inactivation en «état stable »	Cerveau, cœur, muscle squelettique
$Ca_v\alpha 2\delta$-4	12p13.3	126	Accroît l'amplitude des courants	Cœur, muscle squelettique, intestin, foie fœtal, érythroblastes, glandes surrénales, hypophyse

Tableau 5. Position sur le chromosome humain, poids moléculaire apparent, rôle et localisation tissulaire des isoformes de la sous-unité $Ca_v\alpha 2\delta$ (Qin, Yagel et al. 2002; Arikath and Campbell 2003; Klugbauer, Marais et al. 2003)

Cependant, ces isoformes sont aussi soumis à l'épissage alternatif et d'autres isoformes ont été identifiés telles que $Ca_v\alpha 2\delta$ -1.a, $Ca_v\alpha 2\delta$ -1.b, $Ca_v\alpha 2\delta$ -1.c, $Ca_v\alpha 2\delta$ -1.d, $Ca_v\alpha 2\delta$ -2.a, $Ca_v\alpha 2\delta$ -2.b et $Ca_v\alpha 2\delta$ -2.c (Klugbauer, Marais et al. 2003).

1.2.1.4 La sous-unité $Ca_v\gamma$

La sous-unité $Ca_v\gamma$ est une protéine membranaire. Elle possède quatre segments transmembranaires et les extrémités N et C-terminales sont intracellulaires. Les boucles extracellulaires sont fortement glycosylées (N-glycosylation) (Jay, Ellis et al. 1990). Jusqu'à nos jours, huit familles de sous-unités $Ca_v\gamma$ ont été découvertes. Leur poids varie entre 28 et 35 kDa. Le rôle physiologique de la sous-unité $Ca_v\gamma$ n'est cependant pas encore clairement établi (Figure1) (Arikath and Campbell 2003).

1.2.2 Propriétés biophysiques

Le mouvement d'ions calcium à travers le canal Ca_v est déterminé par l'importance du gradient chimique couplé à la présence d'un potentiel membranaire. La concentration cellulaire de calcium est environ 1000 fois plus faible que la concentration extracellulaire (Partie 1.1). Ainsi, selon la loi de diffusion de Fick, les ions vont aller du compartiment le plus concentré vers le compartiment le moins concentré. Dans notre cas, du côté extracellulaire vers le côté intracellulaire. Cependant, la membrane plasmique cellulaire est soumise à un voltage. Au repos, le potentiel de membrane (déterminé par les ions K^+) est d'environ -80 mV. Dès lors, deux facteurs interviennent dans la diffusion des ions : le voltage et la concentration ionique. On parle alors de gradient électrochimique. C'est l'équation de Nernst qui détermine le potentiel électrochimique d'un ion donné à l'équilibre (en absence de mouvement ionique), c'est-à-dire le potentiel mesuré.

$$E_{Ca} = \frac{RT}{z_{Ca}F} \ln \frac{[Ca]_{ext}}{[Ca]_{int}} \approx 120mV$$

Avec $RT/zF \approx 25$ mV à 22°C, $z_{Ca} = 2$, $[Ca^{2+}]_{ext} = 1.5$ mM et $[Ca^{2+}]_{int} = 10^{-4}$ mM

R : constante des gaz parfaits T : température (en degrés Kelvin) F : constante de faraday (en Coulomb).

Le potentiel de Nernst pour les ions calcium est de 120 mV. Cela signifie que pour tout potentiel membranaire situé en dessous de cette valeur, les ions vont rentrer dans la cellule quand le canal va s'ouvrir et pour tout potentiel membranaire supérieur à cette valeur, les ions sortiront de la cellule. Si le potentiel est égal à cette valeur alors les ions ne se déplaceront pas. Les canaux de type VDCC sont dans l'état fermé au potentiel de repos de la cellule. Lorsque la cellule est dépolarisée, pour quelques raisons, le canal s'ouvre et passe éventuellement dans un état inactivé en suivant une cinétique qui dépend du type de canal. Le retour à l'état fermé demande que la cellule revienne à son potentiel de repos. Ces changements de conformation et les différents états (ouvert, inactivé, fermé) sont intrinsèques à un canal donné et sont collectivement appelés par le mot anglais « gating » (Yellen 1998).

1.2.2.1 Activation

Il n'existe, jusqu'à présent, aucune structure cristalline à haute résolution pour les canaux calciques dépendants du voltage (Ca_v). Toutefois, de nombreuses structures cristallines de canaux potassiques ont été résolues. À ce jour, quatre canaux potassiques bactériens ont été cristallisés : KcsA et KirBac1.1 à l'état fermé, MthK et KvAP à l'état ouvert ainsi qu'un canal présent chez les mammifères $K_v1.2$ (de type Shaker) (Doyle, Morais Cabral et al. 1998; Perozo, Cortes et al. 1999; Hackos, Chang et al. 2002; Jiang, Lee et al. 2002; Kuo, Gulbis et al. 2003; Lee, Lee et al. 2005; Long, Campbell et al. 2005).

Il existe une analogie dans la structure secondaire prédite entre les canaux calciques dépendants du voltage (Ca_v) et les canaux potassiques Kv faisant partie de la famille des canaux à six passages transmembranaires. L'homologie est significative et particulièrement dans les régions présumées transmembranaires (Figure 7).

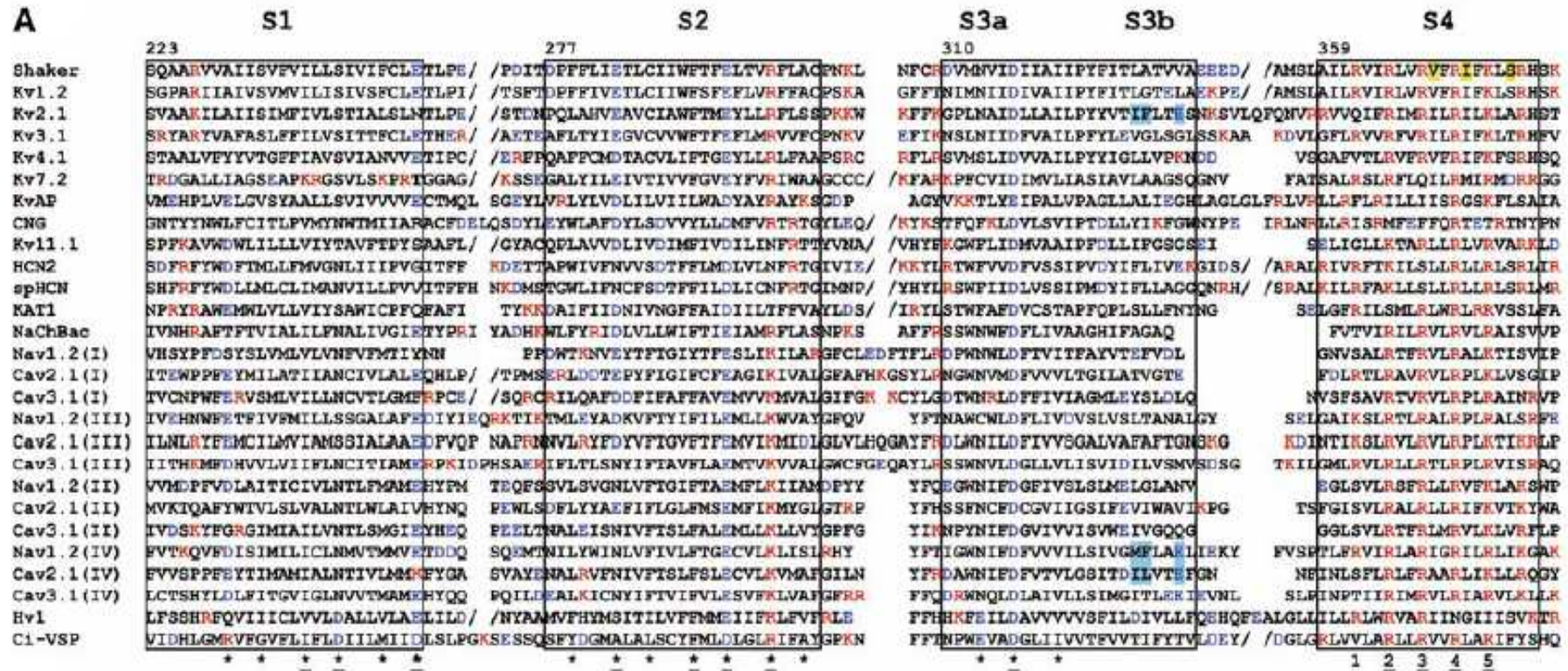


Figure 7. Analogie de séquence entre canaux calciques, sodiques et potassiques. Les résidus chargés positivement sont indiqués en rouge, les résidus chargés négativement sont indiqués en bleu (Borjesson et Elinder 2008).

Les résidus positifs du segment S4 sont très fortement conservés et le segment S1 possède un acide glutamique conservé à sa fin. Le segment S2 renferme un acide aspartique ou glutamique au début et au milieu. Le segment S3 possède aussi un acide glutamique ou aspartique conservé.

Différentes parties du canal sont importantes pour l'activation du canal. Il s'agit du segment S4, aussi appelé senseur du voltage, des segments S5 et S6 qui vont former le pore et qui possèdent aussi le filtre de sélectivité. Cependant, il semblerait que les autres segments jouent aussi un rôle.

Le segment S4 est riche en résidus chargés positivement, essentiellement des arginines. Les quatre premières, nommées R1 à R4 ont été proposées pour être les plus importantes pour la sensibilité au voltage (Nishizawa and Nishizawa 2008). Les charges positives sont trouvées toutes les trois positions et se retrouvent sur un seul côté de l'hélice. Les résidus chargés négativement dans S1 et S3 interagissent avec ceux du segment S4 chargés positivement en dedans de la membrane, alors qu'à la surface, ces derniers vont interagir avec les têtes lipidiques (négatives). On obtient cette conformation dans l'état fermé. Lorsque la cellule est au potentiel de repos (≈ -80 mV), S4 se situe dans une position proche du milieu intracellulaire. Ensuite, lorsque la cellule est dépolarisée, S4 se déplace du côté extracellulaire. Ce mouvement provoque alors l'ouverture du canal ce qui permet alors aux ions de passer. Ce déplacement de charge peut être mesuré avec différentes techniques dont l'appareillage de « Cut-open oocyte », qui permet de mesurer, avant l'ouverture propre du canal, ce courant induit par les déplacements de charges et appelé courant de « gate ». Dans le cas des canaux calciques, neuf charges sont transférées (Noceti, Baldelli et al. 1996). Cependant, la manière avec laquelle bouge le segment S4 n'est pas encore connue. Il existe en réalité trois modèles.

Le premier modèle consiste en un modèle appelé vis-hélice ou hélice coulissante. Dans ce modèle, proposé pour la première fois en 1986 par Catterall et Seetharamalu (Catterall 1986; Guy and Seetharamulu 1986), les charges positives du segment S4 interagissent avec les charges négatives d'autres parties du canal. Lorsque le potentiel membranaire change, S4 bouge de 4,5 Å et tourne de 60° sur son axe afin de faire de nouveaux contacts avec les charges négatives. Pour transférer trois charges par sous-unités, S4 doit bouger ainsi trois fois, ce qui revient à une translation de 13,5 Å et une rotation de 180° (Elinder, Nilsson et al. 2007).

Le deuxième modèle suggéré en 1997 et 2000 par le groupe de Bezanilla (Bezanilla 2000) est appelé « à la manière d'un transporteur », hélice-penchée ou encore banane à balancement. Dans ce cas-ci, la translation verticale de S4 serait moins importante (2 à 4 Å) que le mouvement de rotation.

Enfin, le troisième modèle proposé en 2003 par le groupe de MacKinnon (Jiang, Ruta et al. 2003), suite à la cristallisation de K_vAp avance l'idée que S4 et S3b (une partie de S3), tous deux réunis formant le « la pagaie du senseur du voltage » sont en contact étroit et ne se quittent jamais durant toute la durée d'un cycle. Au début, ce modèle favorisait un large mouvement vertical du segment S4 qui passait d'une conformation horizontale parallèle au plan transmembranaire à une conformation verticale perpendiculaire. Le mouvement était par contre plus ample que les autres modèles (15-20 Å).

Chacun de ces modèles sont différents, du fait que les techniques utilisées diffèrent. Le modèle de l'hélice-vis a été proposé à la fois en analysant la structure primaire du canal sodique de l'organisme *electrophorus electricus*, ainsi que l'accessibilité des résidus de S4 aux MTS (méthane thio-sulfonate), en introduisant dans ce segment des cystéines. Différentes méthodes ont été utilisées pour soumettre le deuxième modèle dont l'accessibilité aux MTS, la neutralisation des charges et le LRET (« Leuthanide-based Resonance Energy Transfer »).

Le troisième modèle est basé sur des expériences de biotinylation. Des cystéines ont été introduites dans S4, puis biotinylées in vitro. Ensuite, le canal a été reconstitué dans une bicouche lipidique artificielle. Il a été déterminé l'accessibilité de l'avidine d'un côté ou d'un autre de la bicouche, ainsi que l'accessibilité en fonction de la dépolarisation de la membrane.

La figure 8 résume ces trois hypothèses.

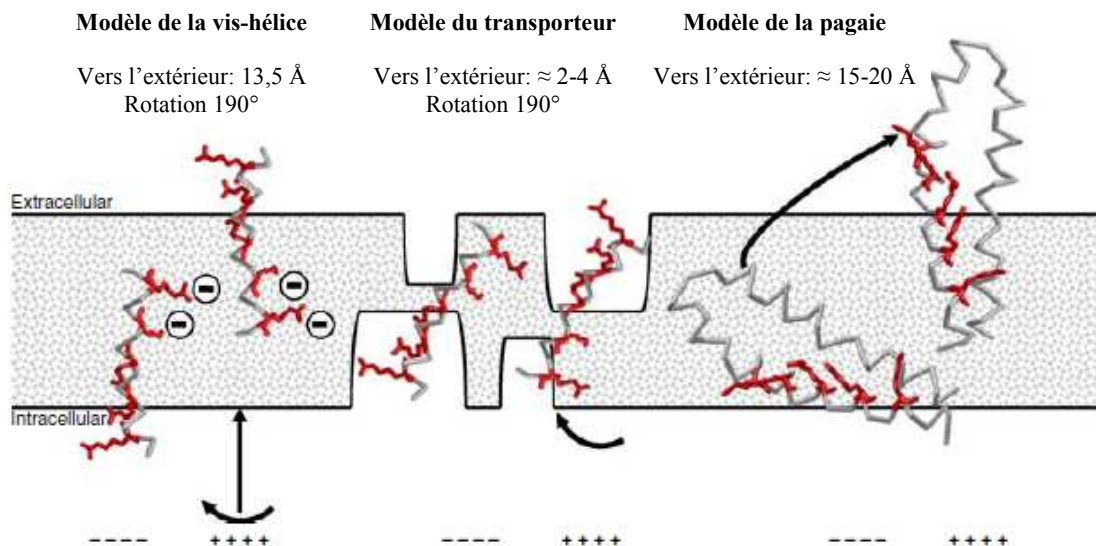


Figure 8. Les trois modèles proposés quant au mouvement du segment S4 lors d'une dépolarisation. Modifié de (Borjesson and Elinder 2008)

Au cours des dernières années, les différences entre ces trois modèles se sont amenuisées. Dans le modèle, l'hélice S4 tourne sur elle-même et se déplace de 6 à 15 Å et les charges positives interagissent avec S2 et S3 (Borjesson and Elinder 2008).

Ainsi, le modèle proposé par l'article d'Elinder est le suivant (Figure 9).

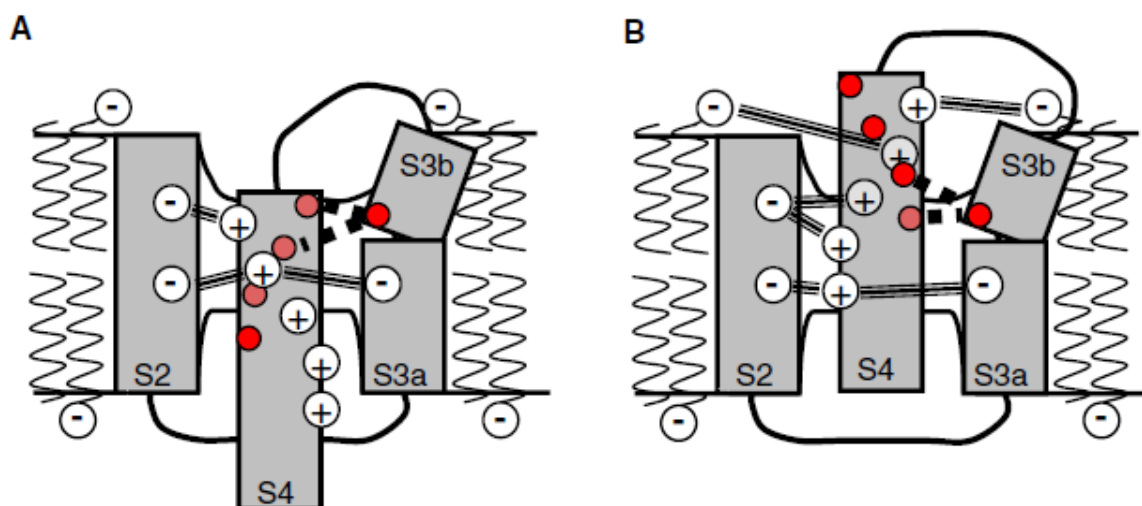


Figure 9. Le mouvement du segment S4, dernier modèle proposé à ce jour. L'hélice se déplace vers le côté extracellulaire d'environ 13 Å et tourne sur elle-même de 180° (Borjesson and Elinder 2008).

D'après la structure cristalline de $K_v1.2$, il a été suggéré un couplage mécanique entre les segments S4 et S5. Ceci s'effectuerait par l'intermédiaire de la boucle intracellulaire S4-S5. Ainsi, plusieurs groupes font des recherches à savoir comment cette boucle pourrait transmettre le mouvement du segment S4 aux segments S5 et S6 pour ouvrir le pore. À ce jour, le mouvement de la boucle est encore sujet à de nombreuses discussions. Cependant, cette dernière pourrait interagir avec la partie terminale cytoplasmique de S6 (Labro, Raes et al. 2008). Ceci a été mis en évidence en effectuant des chimères entre les canaux potassiques $hK_v1.5$ et $hK_v2.1$. Il existe deux modèles quant aux mouvements du segment S6 pendant l'activation du canal. Le premier est basé sur le fait qu'une glycine universelle (conservée) se trouve au niveau de la partie interne du pore sur le segment S6. La glycine étant l'acide aminé le plus petit, il est cohérent de penser que l'hélice S6 va pouvoir se courber au niveau de cette glycine pour permettre l'ouverture du pore (Elinder, Nilsson et al. 2007). Cette hypothèse est cependant basée sur la structure cristalline incomplète du TM2 du canal MThK. L'analyse aux rayons X du canal potassique K_vAp a ensuite appuyé cette hypothèse puisqu'il a été aussi constaté une courbure associée à une glycine. De plus, cette glycine est également conservée dans les canaux calciques mais seulement dans le segment S6 du domaine I (Figure 10).

		S6 or TM2			
				S6 Gate	
Kv1.2		GKIVGSLCAIA	G VLTIALPVPVIVSNFNY		
Shaker		GKIVGSLCAIA	G VLTIALPVPVIVSNFNY		
Kv 2.1		GKIVGGLCCIA	G VLVIALPIPIIVNNFSE		
KvAP		GKVI GIAVMLT	G ISALTLLIGTVSNMFQK		
KcsA		GRLVAVVVMVA	G ITSFGLVTAALATWFGV		
MthK		GMFTVTLLIVL	G IGTFAVAVERLLEFLIN		
KirBac		AHA IATLEIFV	G MSGIALSTGLVFARFAR		
Ca_v1.2 (lapin) (Genbank X15539)					
IS6	411	PWVYFVSLVIF	G SFFVLNLVL G VLS G E		437
IIS6	759	VCIFYITLFC	G NYILLNVFLAIAVDN		785
Ca_v1.2 (humain) (Genbank NM000719)					
IS6	381	PWIYFVTLLII	G SFFVLNLVL G VLS G E		407
IIS6	729	VCIFYIILFC	G NYILLNVFLAIAVDN		755

Figure 10. Alignement de séquence du segment 6 ou TM2 de certains canaux potassiques avec le canal calcique Ca_v1.2. La glycine universelle est conservée dans les canaux potassiques mais aussi dans les canaux calciques. On note aussi la présence de deux autres glycines conservées dans les canaux calciques et le motif PVP dans Kv1.2 et le shaker. Modifié de (Kitaguchi, Sukhareva et al. 2004).

Le deuxième modèle est basé sur le fait que dans le shaker et dans certains autres canaux potassiques des eucaryotes, une séquence PVP (Proline-Valine-Proline) est retrouvée au niveau du segment S6. Cette séquence permettrait aussi à l'hélice de se courber pour ouvrir le canal, du fait que la valine, petit acide aminé, se trouve entre deux prolines, acide aminé qui perturbe la structure en hélice alpha. Ces trois acides aminés vont créer une courbure. En 2004, le groupe de Yellen a étudié la formation de ponts-métaux autour de la séquence PVP entre des histidines et/ou cystéines et l'ion cadmium. Ainsi, ils ont pu déterminer l'accessibilité de certains résidus à cet ion, ceci pouvant stabiliser le canal dans l'état ouvert. De plus, l'inhibition de l'ion peut se faire de façon réversible ou irréversible lorsque le pont implique quatre résidus (Webster, Del Camino et al. 2004). On précise que plusieurs inhibiteurs peuvent se fixer dans cette région comme l'anesthésiant suivant : la bupivacaïne (Elinder, Nilsson et al. 2007).

Que penser de ces deux modèles ? Une approche intéressante serait celle de l'évolution. En effet, comme dit précédemment, le motif PVP est conservé chez les eucaryotes alors qu'il est présent de manière non systématique chez les procaryotes. Le motif PVP serait alors une évolution au niveau du processus d'ouverture du canal. Mais la glycine est toujours indispensable puisque strictement conservée à la fois chez les eucaryotes et les procaryotes. Ainsi, les deux phénomènes interviendraient. Si l'on compare la séquence primaire des canaux potassiques K_v avec celle des canaux calciques Ca_v , il semblerait que le motif PVP soit absent. Cependant, les canaux calciques sont théoriquement des « descendants » des canaux potassiques. Nous devrions retrouver au moins le motif PVP dans les canaux calciques, ce qui n'est pas le cas. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la séparation s'est faite avant l'événement qui a fait apparaître le motif PVP chez les canaux potassiques.

1.2.2.2 Inactivation

Tous les canaux, dits dépendants du voltage, ont la propriété de s'inactiver en présence d'un voltage dépolarisant appliqué continuellement. C'est l'inactivation qui dépend du voltage (VDI : Voltage Dependence of Inactivation). Cependant, certains canaux Ca_v sont capables aussi de s'inactiver suite à une entrée de calcium. Il s'agit de l'inactivation qui dépend du calcium. (CDI : Calcium Dependence of Inactivation).

Lorsque différents types de canaux calciques de type HVA sont exprimés sans sous-unité auxiliaire ($Ca_v\beta$, $Ca_v\alpha2\delta$, ou encore $Ca_v\gamma$), les courants obtenus en absence complète d'ions divalents montrent une forte inactivation dépendante du voltage. Ce qui suggère que la structure même de la sous-unité $Ca_v\alpha1$ possède tous les déterminants pour ce genre d'inactivation. Ce phénomène a été étudié pour la première fois en 1994 par le groupe de Zhang. La création d'un hybride entre $Ca_v2.1$ et $Ca_v2.3$ avait amené à conclure que le segment IS6 était responsable de la différence d'inactivation observée entre ces deux types de canaux (Zhang, Ellinor et al. 1994).

En 2001, le groupe de Lucie Parent prouva, aussi, en utilisant des chimères de $Ca_v1.2$ et $Ca_v2.3$, que les segments transmembranaires du domaine I n'étaient pas importants pour l'inactivation dépendante du voltage. Cependant, introduire le domaine AID de $Ca_v1.2$ dans $Ca_v2.3$ ralentissait les cinétiques d'inactivation (Bernatchez, Berrou et al. 2001).

Le groupe de Zamponi en 2000 a changé le domaine II et/ou le domaine IIS6 dans $Ca_v1.2$, dont l'inactivation est lente, par les domaines de $Ca_v2.3$ dont l'inactivation est rapide. Il a été constaté que les cinétiques d'inactivation de $Ca_v1.2$ ont été accélérées (Stotz, Hamid et al. 2000). Des mutations dans le IIS6, IIS6 et IVS6 altèrent l'inactivation des canaux de type L (Hering, Aczel et al. 1996; Hering, Berjukow et al. 1998; Kraus, Sinnegger et al. 1998; Berjukow, Marksteiner et al. 2001; Stotz and Zamponi 2001). Par exemple, le groupe de Berjukow ont montré que la substitution d'une méthionine dans le IVS6 par une glutamine accélérerait de 75 fois les constantes d'inactivation du canal $Ca_v2.1$. Stotz et Zamponi, proposaient que le remplacement d'une phénylalanine dans le IIS6 accélérerait aussi les cinétiques d'inactivation. En 2006, le groupe de L. Parent a montré que les résidus glycines conservés du IS6 sont importants pour l'inactivation du canal $Ca_v1.2$ (Raybaud, Dodier et al. 2006). Ces recherches ont amené à penser que tous les segments de la sous-unité formant le pore jouent un rôle dans l'inactivation dépendante du voltage. Différentes expériences menées par différents laboratoires ont apporté différentes preuves quant à un mécanisme de la « chaîne et de la balle » (« ball and chain ») ou encore appelé « hinged-lid ». La boucle I-II du domaine I serait impliquée (Bourinet, Soong et al. 1999; Bernatchez, Berrou et al. 2001; Berrou, Bernatchez et al. 2001).

Une analyse de mutagenèse dirigée de la boucle I-II du canal $Ca_v2.3$ montre l'implication de résidus chargés négativement au niveau de la partie N-terminale de l'AID (E461, E462 et D463). Ces résidus sont indispensables pour l'interaction protéine-protéine entre les sous-unités $Ca_v\alpha1$ et $Ca_v\beta$ (Dafi, Berrou et al. 2004).

Le C-terminal et le N-terminal ont aussi été proposés pour intervenir dans l'inactivation dépendante du voltage du canal $Ca_v2.1$ (Stotz, Jarvis et al. 2004). Une dernière remarque est que la boucle III-IV pourrait interagir avec la boucle I-II en absence de sous-unité $Ca_v\beta$ (Kaneko, Cooper et al. 2002).

Le modèle du « Ball and Chain » peut être ainsi schématisé comme le montre la Figure 11.

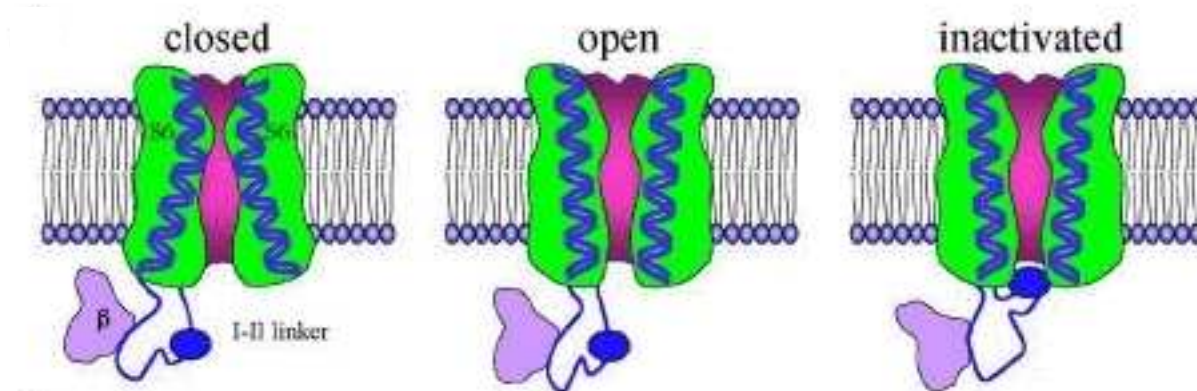


Figure 11. Schématisation du modèle du « Ball and Chain » qui inactive le canal. La boucle reliant les segments I et II du domaine I pourrait se replier sous la face cytoplasmique du canal et prévenir l'influx d'ions calcium à travers le canal (Stotz, Jarvis et al. 2004).

L'inactivation dépendante du calcium (CDI) dépend de la calmoduline qui se lie sur le C-terminal en un site particulier appelé domaine IQ (Isoleucine, glutamine). Cette protéine est dépendante du calcium et devient active en présence de cet ion. Lorsque le calcium se fixe sur la calmoduline, cette dernière change de conformation et peut jouer son rôle en inactivant le canal calcique. En 2005, le groupe de Minor est parvenu à co-cristalliser le complexe que forme l'extrémité C-terminale du canal calcique $\text{Ca}_v1.2$ humain avec la forme humaine de la calmoduline (Van Petegem, Chatelain et al. 2005). Ainsi, le domaine IQ formerait une hélice α et la calmoduline viendrait « s'enrouler » autour de cette dernière grâce à ses deux lobes, C et N-terminaux (Figure 12).

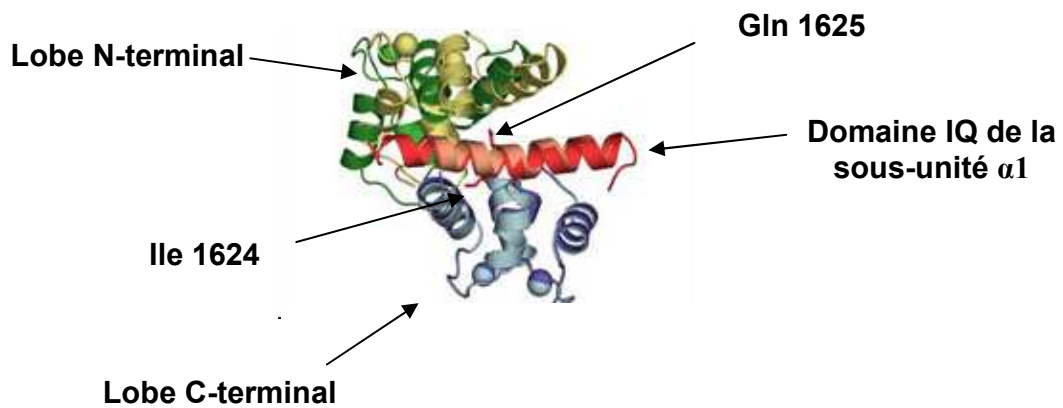


Figure 12. Structure cristalline du complexe Ca^{2+} / Calmoduline / domaine IQ. Il s'agit d'une structure qui a été effectuée sur le clone humain de $\text{Ca}_v1.2$. Les chaînes latérales de l'isoleucine et de la glutamine sont indispensables pour l'interaction entre le C-terminal et la calmoduline. Modifié de (Van Petegem, Chatelain et al. 2005).

Les interactions entre la calmoduline et l'extrémité C-terminale se font à la fois par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes mais aussi d'interaction électrostatiques (Figure 13).

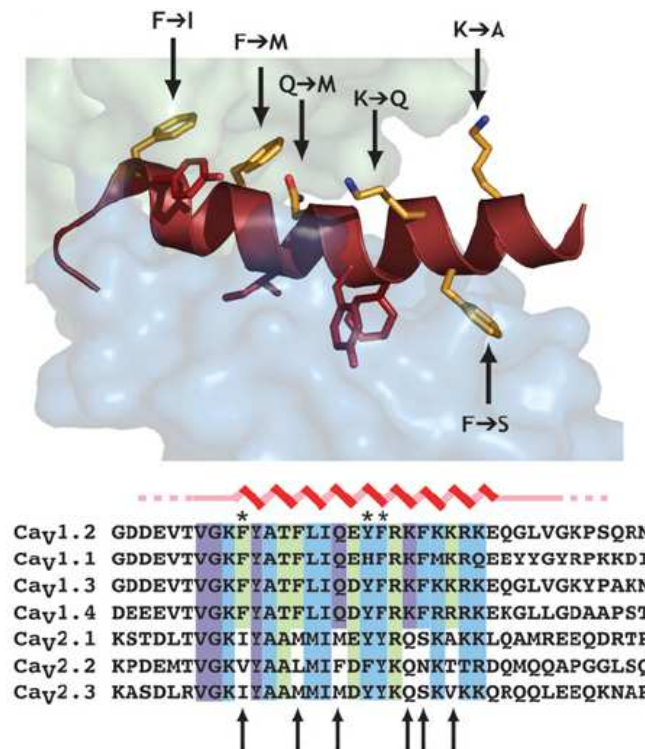


Figure 13. Interaction s’effectuant lors de la formation du complexe Ca^{2+} /CaM/Domaine IQ. On remarque dans cette figure, les acides aminés qui interviennent pour l’interaction. Le bas de la figure montre l’alignement fait avec les autres canaux calciques (toutes sont des séquences humaines sauf celle de Ca_v2.3 qui est celle du rat) (Van Petegem and Minor 2006).

Ainsi, physiologiquement, lorsque la concentration locale de calcium atteint un certain seuil, les sites de fixation au calcium de la calmoduline deviennent occupés et la calmoduline est activée. Ceci entraînerait une facilitation de l’inactivation en présence de calcium et le canal deviendrait alors inactivé plus rapidement. À ce jour, la manière avec laquelle la calmoduline inactive le canal est encore inconnue.

Ceci concorde avec la régulation des canaux calciques. Lorsque le canal s’ouvre, la quantité de calcium augmente sensiblement. Pour empêcher que cette dernière n’augmente trop, le calcium exerce alors un rétrocontrôle négatif sur le canal en l’inactivant plus rapidement.

1.2.3 Modulation des propriétés de gating par les sous-unités auxiliaires

Chaque sous-unité auxiliaire et chacune de leur isoforme ont des propriétés particulières donnant ainsi des propriétés caractéristiques à la famille du canal qui leur est associé. C'est aussi pour cela que l'on retrouve certains isoformes dans des tissus particuliers permettant d'établir des fonctions correspondant idéalement aux demandes physiologiques du tissu concerné (Tableaux 6 et 7).

Concernant l'effet de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$, cette dernière, en général, augmente les densités de courants et module les cinétiques d'activation et d'inactivation des canaux $\text{Ca}_v\alpha1$ de type HVA. Pour la majorité des canaux HVA, les sous-unités $\text{Ca}_v\beta1$ et $\text{Ca}_v\beta3$ déplacent les potentiels de mi-activation et de mi-inactivation vers des potentiels hyperpolarisants et accélèrent l'inactivation du canal. Par contre, la sous-unité $\text{Ca}_v\beta2a$ tend à déplacer l'activation du canal vers des potentiels dépolarisants et à ralentir les cinétiques d'inactivation (Walker and De Waard 1998). Le ralentissement s'observe principalement avec la sous-unité $\text{Ca}_v\beta2a$ qui est palmitoylée en position 2 et 4 (Leroy, Richards et al. 2005).

$\text{Ca}_v\alpha2\delta$ augmenterait l'amplitude des courants, une accélération des cinétiques d'activation et d'inactivation et un décalage vers des potentiels hyperpolarisants de la dépendance au voltage (Andrade, Sandoval et al. 2007). Ceci reste encore à être confirmé par des études plus approfondies.

Le rôle de la sous-unité $\text{Ca}_v\gamma$ et de ses isoformes est essentiellement de réduire les courants calciques et par conséquent de jouer un rôle inhibiteur sur le canal calcique $\text{Ca}_v1.1$ (Arikkath and Campbell 2003).

1.3 Le rôle de l'extrémité C-terminale du canal calcique $\text{Ca}_v1.2$

Selon les modèles structuraux les plus courants, l'extrémité C-terminale serait située dans le milieu intracellulaire. Elle pourrait jouer différents rôles très importants de régulation du canal. Son rôle a été davantage étudié dans le cas du canal calcique $\text{Ca}_v1.2$ dont l'épissage alternatif produit des protéines natives tronquées en C-terminal (Liao, Yong et al. 2005). Il a été découvert par le groupe de Catterall en 1991 que les canaux calciques Ca_v1 étaient tronqués physiologiquement. Ce groupe a procédé à un lysat cellulaire d'une préparation de muscle squelettique. Ils ont constaté que la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha1$ était tronquée d'environ 50 kDa par rapport au poids attendu (De Jongh, Warner et al. 1991). En 1993, le même groupe prouva le même phénomène au niveau du canal calcique présent au niveau du cerveau (Hell, Yokoyama et al. 1993). En 2000, le groupe de Marlene Hosey le prouva au niveau des cellules cardiaques (Gerhardstein, Gao et al. 2000).

1.3.1 La sous-unité $\text{Ca}_v1.2$ tronquée en C-terminal

Différentes questions se sont posées et plusieurs groupes se sont intéressés au rôle que pouvait jouer cette troncation. Le groupe de Marlene hosey en 2001 a testé différentes mutations en C-terminal. Les troncations ont mené, à chaque fois, à des courants 10 à 15 fois plus élevés en configuration cellule entière. Ils ont alors émis l'hypothèse que le C-terminal du canal serait inhibiteur du canal lui-même. Afin de déterminer où se trouve ce peptide inhibiteur, ils ont procédé à des expériences de co-immunoprécipitation. Plusieurs peptides ont été synthétisés dont la séquence était exactement la même que certaines parties du C-terminal (1622-2171/1509-1905/1622-1733/1622-1905/1909-2171/1909-2024/2030-2171). Ces derniers ont été mis en présence du canal de type sauvage mais aussi de différents mutants tronqués ($\Delta\text{C}2024$, $\Delta\text{C}1905$, $\Delta\text{C}1733$, $\Delta\text{C}1733\text{-}2024$, $\Delta\text{C}1733\text{-}1905$ avec $\Delta\text{C}2024$ et $\Delta\text{C}1733\text{-}1905$). Après avoir constaté des hybridations entre différents mutants et différents peptides, ils ont conclu que le peptide inhibiteur se trouvait entre les acides aminés 2024 et 2171 et que ce dernier s'hybride sur la région comprise entre les résidus 1733 et 1900 (Gao, Cuadra et al. 2001).

En 2006, le groupe de Catterall précise cette notion en effectuant des analyses plus électrophysiologiques de ce phénomène. Dans le cas du canal tronqué (isoforme du lapin), le couplage entre le gating et l'ouverture du canal était sensiblement facilité. Afin de déterminer les domaines du C-terminal qui interagissent, le canal a été tronqué de différentes manières ($\Delta C1731$, $\Delta C1701$ et $\Delta C1693$ avec ou sans le peptide 1822-2171). Les délétions seules montraient le même phénomène que le $\Delta C1821$ et l'ajout du peptide a diminué les courants maximum. Par contre, $\Delta C1693$ n'a subi aucun effet inhibiteur de la part du peptide. Des analyses de prédiction de structure indiquent que les acides aminés 1694 à 1700 formeraient une hélice α . Ce domaine serait alors celui sur lequel le peptide inhibiteur serait susceptible de se fixer. Des études plus précises ont montré que les arginines 1696 et 1697 étaient indispensable pour que le peptide puisse faire son effet.

Afin de déterminer plus précisément la région du peptide inhibiteur, Catterall a de nouveau effectué des prédictions de structure et son groupe a constaté que la région de 2062 à 2115 serait susceptible de former un assemblage d'hélices α et en positions 2103, 2106 et 2110. Des acides aminés chargés sont retrouvés dans cette région, respectivement un acide glutamique pour 2103 et 2106 et un acide aspartique pour le résidu 2110. Après avoir effectué plusieurs mutations de ces résidus, ils en ont conclu que ces derniers étaient indispensables pour que le peptide inhibiteur puisse être effectif (Hulme, Yarov-Yarovoy et al. 2006).

1.3.2. Interaction avec la calmoduline

Le canal interagit avec la calmoduline, protéine dépendante du calcium, au niveau des acides aminés I1624 et Q1625 mais aussi avec la région entourant ces deux résidus indispensables (Figure 12). Le domaine d'interaction se situe entre les acides aminés 1617-1634 (Van Petegem and Minor 2006).

1.3.3 Régulation par des kinases et des phosphatases

1.3.3.1 Régulation par des kinases

Dans le cas des cellules cardiaques, la protéine kinase A (« PKA ») est activée par la fixation de la noradrénaline sur le récepteur β adrénergique couplé aux protéines G trimériques ($\alpha\beta\gamma$). Cette interaction va permettre à la protéine couplée au récepteur de se dissocier en deux parties : la protéine $G\alpha$ et la protéine $G\beta\gamma$.

$G\alpha$ va pouvoir activer l'adénylate cyclase, qui à partir de l'ATP, produit de l'AMP cyclique. Cette augmentation d'AMP va alors activer la PKA qui pourra phosphoryler ses cibles (Cabrera-Vera, Vanhauwe et al. 2003). La PKA a aussi besoin de l'AKAP15 («A Kinase Anchoring Protein »), qui est une protéine d'ancrage, pour jouer son rôle. Ce complexe va phosphoryler la sérine 1928 du canal $Ca_v1.2$ (Hulme, Lin et al. 2003; Hulme, Westenbroek et al. 2006).

Le groupe de Catterall a récemment confirmé la phosphorylation du canal par la PKA en C-terminal du canal $Ca_v1.2$ au niveau d'un motif « Leucine Zipper » (Hulme, Westenbroek et al. 2006).

La PKC peut aussi phosphoryler la sous-unité $Ca_v\alpha1$ de $Ca_v1.2$ au niveau du même acide aminé que celui phosphorylé par la PKA. La PKC est une sérine/thréonine kinase qui est composée d'une région régulatrice en N-terminal et une région catalytique en C-terminal. Elle est activée par le Diacylglycérol (DAG). Ce dernier est produit en réponse à des hormones qui se fixent sur leurs récepteurs tels que le récepteur α adrénergique, le récepteur à l'angiotensine II et à l'endothéline-1. Ainsi, l'activation de la PKC ou de la PKA va dépendre du type de récepteur. Il semblerait que l'effet ultime soit le même puisque dans les deux cas, la sérine 1928 est phosphorylée.

En 2009, le groupe de Kameyama a montré que la thréonine 1604 était phosphorylée par la calmoduline Kinase II afin de contrôler l'activité de la calmoduline. Cette phosphorylation facilite en réalité l'accrochage de la calmoduline au C-terminal au niveau du domaine IQ et permet de maintenir l'activité basale de $Ca_v1.2$ (Wang, Hao et al. 2009).

1.3.3.2 Régulation par des phosphatases

Pour éviter l'activation permanente de $\text{Ca}_v1.2$, la PPIIA déphosphoryle la sérine 1928 qui a été susceptible d'être phosphorylée soit par la PKA, soit par la PKC. Le groupe de Hell a montré qu'il s'agit de la seule phosphatase qui immunoprécipite avec $\text{Ca}_v1.2$. Elle se fixerait sur les acides aminés 1958 à 2000 (Hall, Feekes et al. 2006).

1.4 Objectifs et hypothèses

1.4.1 Les délétions en C-terminal

Dès 1991, il s'est avéré que la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha1.2$ native chez le lapin migrerait sur gel avec une différence de poids moléculaire de 50 kDa plus petit que le poids révélé par la protéine $\text{Ca}_v\alpha1.2$ recombinante exprimée dans des cellules fibroblastiques murines (De Jongh, Warner et al. 1991). Cette observation suggère que le canal natif pourrait être tronqué en conditions physiologiques mais le mécanisme moléculaire de cette délétion était inconnu. En 2005, il a été mis en évidence que la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha1$ du canal calcique $\text{Ca}_v1.2$ peut être soumise à l'épissage alternatif au niveau de son extrémité C-terminale (au niveau de l'exon 45) (Liao, Yong et al. 2005) et ceci provoquerait l'apparition d'un codon stop et ainsi une délétion au niveau du C-terminal. Le Dr Ramon Brugada a confirmé que 20 à 30% des porteurs sains de $\text{Ca}_v1.2$ testés chez lui possèdent un codon stop à la position 1965 (communication personnelle). La position 1965 est la numérotation des résidus du clone humain qui ne diffère de celle du lapin (clone que nous utilisons) que de 30 acides aminés dans le N-terminal. La séquence primaire entre le clone du lapin et celui de l'humain est homologue à 99%. Les résultats préliminaires que nous avons obtenus dans notre laboratoire ont été effectués dans les ovocytes de Xénope avec la méthode du voltage imposé en double électrode. Les délétions de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha1.2$, ΔC1733 , ΔC1856 , ΔC1935 et ΔC2033 ont généré des courants macroscopiques plus élevés que le canal de type sauvage dans les mêmes conditions et une expression des mutants en absence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta3$. Dans le cas de la délétion ΔC1700 aucun courant n'a pu être mesuré. En 1994, le groupe de Birnbaumer avait déjà documenté les propriétés physiologiques des délétions ΔC1856 , ΔC1733 et ΔC1700 dans les ovocytes de Xénope (la numérotation des résidus est celle provenant du clone du lapin).

Chacune de celles-ci ont montré une augmentation des courants globaux mais les propriétés biophysiques des protéines tronquées étaient semblables à celles des protéines $\text{Ca}_v1.2$ « pleine longueur » (Wei, Neely et al. 1994).

En 2001, le groupe de Marlene Hosey montra le même phénomène dans les cellules HEKT avec les délétions $\Delta\text{C}2024$, $\Delta\text{C}1905$, $\Delta\text{C}1733$ (numérotation des résidus provenant de celle du clone du lapin) (Gao, Cuadra et al. 2001). Il a paru intéressant de tester ces mutations, suite aux observations récentes qui proposent que le C-terminal interagirait, dans certaines conditions, avec le groupement $-\text{SH}3$ des sous-unités auxiliaires $\text{Ca}_v\beta$ (Lao, Kobrinsky et al. 2008). Nous avons décidé de tester les mutants $\Delta\text{C}2033$, $\Delta\text{C}1935$, $\Delta\text{C}1856$, $\Delta\text{C}1733$, $\Delta\text{C}1700$ avec et sans la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta3$.

1.4.2 L'expression dans les cellules HEKT

Les observations précédentes indiquaient une augmentation du courant macroscopique mais ce dernier est la somme de trois paramètres : Δi , P_o et n (avec Δi , le courant unitaire d'un seul canal, P_o , la probabilité d'ouverture du canal et n , le nombre de canaux à la membrane plasmique). Dans le but de déterminer si l'augmentation de courant était due à l'augmentation du nombre « n » de canaux, les délétions $\Delta\text{C}1935$, $\Delta\text{C}1856$ et $\Delta\text{C}1733$ ainsi que le canal de type sauvage ont été exprimées dans les cellules HEKT. Notre laboratoire possède une lignée cellulaire exprimant constitutionnellement la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta3$. La sous-unité $\text{Ca}_v\alpha1.2$ sera exprimée soit dans ces cellules (HEKT transfectées de façon stable avec la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta3$) ou dans des cellules HEKT (sans la sous-unité $\text{Ca}_v\beta3$). Afin de quantifier l'expression du canal à la membrane dans le cas du canal calcique $\text{Ca}_v1.2$ de type sauvage et tronqué, la technique de FACS a été choisie. L'épitope HA a été introduit dans la boucle extracellulaire qui relie les segments S1 et S2 du domaine I. Cet épitope est constitué de neuf acides aminés (YPYDVPDYA) qui ont été insérés par mutagenèse dirigée dans la séquence de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha1$ de $\text{Ca}_v1.2$, sans changement dans le cadre de lecture et sans introduction de mutation. Cette position a été choisie car cette boucle est éloignée des segments constituant le pore et ne possède pas de site de glycosylation. Ainsi, il a été supposé que l'introduction de l'épitope HA ne perturberait pas ou peu la fonction du canal. Les anticorps commerciaux disponibles reconnaissant la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha1.2$ se fixent sur des parties strictement intracellulaires.

En effet, dans le cas du FACS, les cellules doivent être intactes et les anticorps anti-HA FITC imperméables à la membrane dirigés contre la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$, doivent reconnaître uniquement les canaux $\text{Ca}_v 1.2$ membranaires. D'autres techniques seront utilisées pour confirmer nos données comme l'immunofluorescence nous permettant de visualiser la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ à la membrane à l'aide d'un anticorps couplé à un fluorophore. La biotinylation des protéines membranaires aurait pu être aussi envisageable mais cette technique est plus qualitative.

1.4.3 Hypothèses

D'après les résultats préliminaires obtenus, la protéine $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ tronquée en C-terminal s'exprime à la membrane en absence de sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ dans les ovocytes de Xénope. Étant donné que le canal $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ de type sauvage ne montre aucun courant en absence de sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$ exogène, il est probable que la protéine est retenue au niveau intracellulaire. En 2000, le groupe de De Waard, a émis l'hypothèse que la boucle I-II qui contient le domaine AID serait susceptible de contenir un signal de rétention au niveau du réticulum endoplasmique (Bichet, Cornet et al. 2000). La sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ va entrer en compétition avec le signal de rétention au niveau du réticulum endoplasmique et va libérer la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$. Nos résultats nous ont mené à formuler l'hypothèse qu'un autre signal de rétention pourrait se trouver dans le C-terminal. Ainsi, il y aurait deux sites d'interaction, pour la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$, dans le AID et dans le C-terminal. Le domaine AID serait le site de haute affinité qui va déterminer les cinétiques d'activation et d'inactivation du canal. L'autre site, de moins forte affinité se situerait au niveau du C-terminal et il pourrait moduler l'expression à la membrane de $\text{Ca}_v\alpha 1.2$.

Nous proposons que ce signal additionnel de rétention se situe au niveau du C-terminal, après la position 1935, en position distale. Ainsi, le C-terminal contiendrait un site inhibiteur ou de rétention dans le réticulum endoplasmique (Figure 14). Dans le cas du canal tronqué, il n'y a plus de site inhibiteur et ainsi la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ peut conduire la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ plus rapidement à la membrane. Cependant, ceci n'explique pas pourquoi, le canal s'exprime en absence de sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ dans les œufs de Xénope. La différence entre les œufs de grenouille et les cellules réside dans le fait que les œufs de grenouille possèdent une sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ constitutive à une concentration d'environ 17 nM (Canti, Davies et al. 2001) qui serait peut-être suffisante pour cibler $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ tronqué à la membrane.

Enfin, il est aussi possible que le C-terminal puisse jouer un rôle au niveau de la stabilité de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha1$ à la membrane. En effet, l'extrémité C-terminale distale pourrait jouer un rôle régulateur dans le recyclage du canal à la membrane. Si le canal est recyclé rapidement, il ne restera pas longtemps à la membrane et les courants macroscopiques seront plus petits. Ainsi, si le canal est tronqué le signal de recyclage ne sera plus présent et le canal restera ainsi plus longtemps à la membrane, ce qui pourrait expliquer l'augmentation des courants observés dans les mêmes conditions.

Le but de cette étude était d'étudier l'expression du canal $\text{Ca}_v\alpha1.2$ dans les cellules HEKT, système d'expression de mammifères. Nous avons tenté de quantifier le canal $\text{Ca}_v1.2$ à la membrane en présence et en absence de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta3$ dans le cas du canal « pleine longueur » et du canal tronqué. Les résultats obtenus dans les œufs et ceux obtenus dans les cellules HEKT ont ensuite été comparés afin de déterminer quel rôle jouait l'extrémité C-terminale dans l'expression à la membrane du canal calcique $\text{Ca}_v1.2$.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Techniques de biologie moléculaire

2.1.1 Matériel utilisé

Les ADNc codants pour les protéines de type sauvage $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ dans le vecteur pGEM 3Z (Lapin, GenBank X15539) et $\text{Ca}_v\beta 3$ dans le vecteur pBluescript (Rat, Genbank M88751) nous ont été donnés par le Dr. Edward Perez-Reyes. La sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 2\delta$ (vecteur pBluescript) (Rat, GenBank NM_00722), nous a, quant à elle, été offerte par le Dr. Terry Snutch. Nous disposons aussi de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ dans le vecteur pRC-CMV (donnée par le Dr Chris Wei) ainsi que dans le vecteur pGW1H (construction donnée par le Dr Mohammed Chahine, Université Laval, Sainte Foy, Québec). Yolaine Dodier, M.Sc a sous-cloné la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ dans le vecteur pCMV-Tag5A (Stratagene, La Jolla, CA). Le Dr Hélène Klein a, quant à elle, sous-cloné la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA (dont la HA a été inséré par Alexandra Raybaud) dans le vecteur pCMV-Tag5a entre les sites EcoRI et HindIII, avec un site EcoRI interne à $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA préalablement supprimé.

2.1.2 Mutagenèse dirigée

Les mutations de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ ont été effectuées par PCR (« Polymerase Chain Reaction ») via la trousse *QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA). Le produit de PCR issu de la réaction est digéré pendant 2 heures à 37°C avec l'enzyme *DpnI* qui dégrade l'ADN parental obtenu après croissance des bactéries (ADN non muté qui a servi de modèle pour l'ADN polymérase). L'ADN est mis sur gel d'agarose 1% (m/v) dans du TAE (« Tris Acetate EDTA ») afin de vérifier son poids moléculaire et son intégrité. Ensuite, le produit de PCR est amplifié dans les bactéries ultracompetentes X-10 Gold fournies avec la trousse *QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA). Leur efficacité est de 5×10^9 cfu/ μg d'ADN pUC. (cfu signifie « Colony Forming Unit »). Après étalement sur boîte de Pétri, plusieurs colonies ont été récupérées et multipliées séparément en milieu liquide LB (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) durant une nuit sous agitation à 37°C.

L'ADN muté ainsi amplifié a été extrait en utilisant la trousse *QIAprep® Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Mississauga, Ont). Les clones, vérifiés par séquençage (IRIC, Université de Montréal) ont ensuite été amplifiés dans des bactéries DH5 α (Invitrogen, Burlington, ON). L'ADN, enfin, a été extrait, purifié grâce à la trousse *QIAfilter® Plasmid Midi Kit* (Qiagen, Mississauga, ON) et utilisé dans les différentes expériences (transfection ou synthèse d'ARN). Par cette technique, Alexandra Raybaud a inséré l'épitope HA en trois étapes. Trois acides aminés par PCR ont été introduits, l'épitope HA étant composé de 9 acides aminés. Trois réactions de PCR ont été nécessaires. Les délétions ont été effectuées en introduisant un codon stop « ATG » aux positions désirées.

2.1.3 Synthèse d'ARN

L'ARN peut être synthétisé à partir des constructions prévues à cet effet (dans les vecteurs pGEM ou pBluescript). Préalablement, l'ADN doit être linéarisé pour permettre la transcription in vitro. Cela est effectué par digestion du plasmide par l'enzyme *HindIII* dans le cas de la sous-unité Ca α 1 dans pGEM. En ce qui concerne les sous-unités auxiliaires, Ca β 3 et Ca α 2 δ , l'enzyme *NotI* est utilisée. Les ARNm sont obtenus grâce à la trousse de transcription *mMessage mMachine® T7 Kit* (Ambion, Austin, TX). Après vérification de leur poids moléculaire et de leur intégrité sur gel d'agarose 1%, ils sont stockés à -20°C.

2.2 Culture cellulaire et transfection des cellules

2.2.1 Culture cellulaire

La lignée cellulaire utilisée dans notre laboratoire est la lignée cellulaire HEK293T (ATCC, Manassas, VA) pour « Human Emryonic Kidney ». Cette lignée est appelée T car ces cellules ont été transfectées avec le gène codant pour le SV40 T-antigen (« Simian vacuolating Virus 40 »). Les cellules sont mises en culture dans des boîtes de pétri (100 mm x 20 mm) (Corning incorporated, Lowell, MA), contenant 10 mL de milieu de culture.

Le milieu de base est le milieu DMEM-HG (« Dulbecco's Modified Eagle Medium-High Glucose ») (Invitrogen, Burlington, ON) additionné de 10% de FBS (« Fetal Bovine Serum ») inactivé par la chaleur (Origine : Etats-Unis ; Invitrogen, Burlington, ON) et de pénicilline (10 unités/mL) ainsi que de streptomycine (10 µg/mL) afin de préserver le milieu de culture des bactéries susceptibles de contaminer les échantillons. L'antibiotique de sélection généticine (Geneticin[®] Selective Antibiotic, Invitrogen, Burlington, ON) (40 µg/mL) sert à cultiver la lignée cellulaire stable HEKT- Ca_vβ3-pCMV-Tag5 conférant la résistance.

Les cellules sont cultivées dans des plats de culture pendant trois mois maximum (le nombre de passage est limité à 25 maximum). A chaque fois que les cellules sont à confluence, c'est-à-dire qu'elles recouvrent la surface de la boîte de pétri, ces dernières sont divisées afin d'être diluées dans une autre boîte de pétri. Le milieu est retiré et les cellules sont lavées avec 2 mL de PBS (« Phosphate Buffer Saline ») (en mg/L : 8000 NaCl ; 200 KCl ; 1440 Na₂HPO₄ ; 240 KH₂PO₄) détachées par 1,5 mL de trypsine-EDTA (Invitrogen, Burlington, ON). Les cellules pourront ensuite être resuspendues dans 10 mL de milieu DMEM-HG. Une partie de ces cellules (environ 200 000) seront ajoutées dans un nouveau plat contenant 10 mL de milieu approprié à la lignée cultivée. Les cellules sont cultivées dans des incubateurs maintenus à 37°C avec un taux de CO₂ de 5%. Les cellules HEKT transfectées de manière stable avec la sous-unité Ca_vβ3 sont cultivées constamment avec l'antibiotique de sélection généticine, sauf au moment de transfecter ces cellules.

2.2.2 Transfection des cellules

Les cellules sont transfectées à l'aide de la lipofectamine (*Lipofectamine[™] 2000 Transfection Reagent*, Invitrogen, Burlington, ON). La transfection est effectuée lorsque les cellules sont à environ 80% de confluence. La lipofectamine, solution de liposomes, va intégrer les molécules d'ADN et fusionner avec la membrane plasmique de la cellule ce qui va permettre à l'ADN de pouvoir entrer dans la cellule.

L'ADN (24 µg) est ajouté à 1,5 mL de milieu Opti-Mem, préchauffé à 37°C (*Opti-MEM® I Reduced-Serum Medium (1X)*, Invitrogen, Burlington, ON). En parallèle, la lipofectamine est ajoutée au milieu Opti-Mem.

Les différents mélanges sont mis à incuber 5 minutes à température ambiante. Les deux solutions ainsi obtenues sont mélangées puis la solution résultante est encore laissée 20 minutes à incuber.

Les 3 mL finaux sont ensuite ajoutés au milieu de culture des cellules, remplacé 1h à l'avance par du milieu DMEM Glucose dépourvu de tout antibiotiques, ces derniers étant nocifs pour l'efficacité de la transfection. Le rapport lipofectamine / ADN est de 2/5 (masse/volume). Les cellules sont laissées à incuber 24 heures dans des incubateurs maintenus à 37°C avec un taux de CO₂ de 5%.

2.3 Immunobuvardage de type Western

2.3.1 Lysat Cellulaire

Les cellules transfectées, après avoir été lavées deux fois avec du PBS-CM (PBS + CaCl₂ 0,1 µM + MgCl₂ 1µM), sont lysées directement sur le plat de culture avec 300 µL tampon de lyse (125 mM NaCl ; 50 mM Tris, pH = 7,5 ; 0,1% SDS ; 0,01% IGEPAL ; 0,5% Sodium Déoxycholate ; 1000 Na₃VO₄, 0,5 % de cocktail d'inhibiteur de protéase (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) pour un volume final de 5 mL). Le lysat est incubé pendant 30 minutes sous agitation à 4°C puis soniqué pendant 20 secondes. Le produit de la sonication est ensuite centrifugé 30 minutes à 10000g à 4°C et le surnageant contenant les protéines est prélevé. Les protéines sont ensuite dosées grâce à la trousse BCATM Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, Etats-Unis) en suivant les instructions du manufacturier.

Dans le cas d'un lysat d'ovocytes de Xénope, dix ovocytes sont rincés avec une solution de Barth (en mM : 90 NaCl ; 3 KCl ; 0.82 MgSO₄ ; 0,41 CaCl₂ ; 0,33 Ca(NO₃)₂ ; 5 HEPES ; pH ajusté avec NaOH à 7,6) et homogénéisés dans du tampon de lyse (PBS 1X, cocktail d'inhibiteur de protéases 1% (Sigma-Aldrich, ST-Louis, MO)).

Les homogénats sont ensuite centrifugés à 500 x g pendant 30 minutes à 4°C. Le culot contenant les membranes totales d'ovocytes est resuspendu dans 20 µL de PBS.

2.3.2 Immunobuvardage de type Western

2.3.2.1 Gel SDS-Page

Les protéines sont séparées par migration à travers un gel SDS-PAGE (« Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide ») en fonction de leur masse molaire. Le gel est constitué d'un gel de séparation (30% acrylamide/bisacrylamide, 1,5 M Tris-HCl pH = 8,8, 10% SDS, 10% Ammonium persulfate, 1% TEMED) précédé d'un gel de concentration (30% acrylamide/bisacrylamide, 1M Tris-HCl pH = 6,8, 10% SDS, 10% ammonium Persulfate). La migration se fait pendant 2 heures à 120 V. Dans le cas des cellules, 50 µg de protéines sont chargés. Dans le cas des lysats d'ovocytes de Xénope, les 20 µL de lysat sont mis à charger. Afin de dénaturer les protéines, les échantillons sont mélangés à une solution de Laemli 1X (1M Tris HCl, pH = 6,8 ; 4% SDS ; 10% glycérol ; 2% β-mercaptoéthanol). Les protéines du lysat ainsi séparées selon leur poids moléculaire, sont transférées (à 100 V pendant 2 heures) sur des membranes de nitrocellulose Hybond C (Amersham Biosciences, Piscataway). Afin d'évaluer la qualité du transfert et du chargement des protéines dans les puits, un rouge ponceau est effectué. Le rouge ponceau est un colorant qui interagit avec les protéines de façon réversible. Cette coloration est réalisée sur chaque membrane de nitrocellulose immédiatement après le transfert. La membrane est recouverte avec la solution de rouge ponceau (rouge ponceau 0,5%, acide acétique glacial 1%), puis agité 2 à 3 minutes. Le rinçage avec de l'eau 18,2 MΩ (eau pure déminéralisée dont la resistivité est égale à 18,2 MΩ) retire tout le colorant qui n'a pas interagi avec les protéines et révèle les nombreuses protéines transférées sur la membrane de nitrocellulose. Les membranes sont ensuite incubées toute une nuit à 4°C dans une solution de blocage (PBS 1X contenant 5% de lait).

2.3.2.2 Immunomarquage

Les anticorps primaires anti-Ca_v1.2 et anti-Ca_vβ3 sont préincubés dans 1% de BSA (« Bovine Serum Albumine ») pendant 1 heure à température ambiante puis sont centrifugés à 10000 x g pendant 5 minutes. Le surnageant est récupéré.

Les incubations de 2 heures pour les anticorps primaires et d'une heure pour les anticorps secondaires sont suivies de quatre étapes de 10 minutes dans du PBS 1X additionné de 0,1% TWEEN 20.

2.3.2.3 Révélation par chimioluminescence

Finalement, les protéines sont détectées par chimioluminescence grâce à la trousse Pierce® ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, Etats-Unis). Le réactif de chimioluminescence est utilisé pour détecter les protéines liées à un anticorps couplé à une molécule HRP (Horseradish Peroxidase). L'enzyme HRP catalyse l'émission de lumière à partir de l'oxydation du luminol (ECL). La lumière est capturée par un film Kodak (Kodak Biomax Film, Sigma-Aldrich®, Oakville, ON).

Les protéines sont révélées avec l'anticorps primaire anti- $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ (1:200) (Alomone, Jérusalem, Israël) ainsi qu'avec l'anticorps secondaire anti-lapin-HRP (1:10000) (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA).

La sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA est révélée avec l'anticorps primaire anti-HA (1:500) (Covance Biotechnology, Québec, Canada) et l'anticorps secondaire anti-souris-HRP (Jackson Immunoresearch ; 1:10000) (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA). Pour révéler la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$, nous utilisons l'anticorps primaire anti- $\text{Ca}_v\beta 3$ (1:200) (Alomone, Jérusalem, Israël) et l'anticorps secondaire anti-lapin-HRP (1:10000) (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA).

2.4 FACS (« Fluorescence Activated Cell Sorting »)

La cytométrie de flux est une technologie qui permet de mesurer simultanément de multiples caractéristiques physiques d'une cellule. Ainsi, il est possible de déterminer sa taille relative (FSC), sa granularité relative (SSC) et l'intensité de la fluorescence émise (FI). L'appareil de FACS utilise un laser et les cellules passent une par une devant ce dernier. Selon la lumière réémise, qui va déterminer à la fois les paramètres FI et SSC et la lumière transmise qui va déterminer quant à elle, le paramètre FSC, les cellules vont pouvoir être triées selon leur propriété. Notre but ayant été de quantifier le canal $\text{Ca}_v 1.2$ à la membrane, nous avons utilisé uniquement les résultats du paramètre FI.

Les cellules, après avoir été décollées du plat avec la Trypsine-EGTA et resuspendues dans 10 mL de milieu DMEM-HG (10% FBS) sans antibiotique, sont centrifugées à 500 x g pendant 5 minutes puis lavées deux fois avec du PBS 1X. Les cellules comptées sur hématimètre sont placées à 2 000 000 de cellules/mL. L'anticorps anti-HA couplé au fluorophore FITC (« Fluoresceine Iso Thio Cyanate ») (Monoclonal anti-HA FITC produit chez la souris) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) est ajouté aux cellules à une concentration de 10 µg/mL. Les cellules et l'anticorps sont incubés 1 heure à température ambiante sous agitation à l'obscurité. L'échantillon est ensuite centrifugé 5 min à 400 x g et le surnageant est jeté. Les cellules sont rincées deux fois dans 500 µL de PBS et le culot final est resuspendu dans 500 µL et transféré dans des tubes spéciaux pour l'analyse au FACS (Tubes de 5 mL, référence : 352054) (BD Biosciences, San Jose, CA) (Les expériences ont été réalisées sous la supervision du Dr Benoîte Bourdin).

L'appareil de FACS utilisé est le FACSCalibur (quatre couleurs) du département de microbiologie et d'immunologie de l'Université de Montréal. Les mesures ont été effectuées par monsieur Serge Sénéchal, technicien du laboratoire de cytométrie en flux.

2.5 Expression fonctionnelle des canaux

L'expression fonctionnelle des canaux se fait au stade V et VI des ovocytes de grenouille, *Xenopus Laevis* (Université d'Alberta, Edmonton, AB). Après avoir été extraits de l'animal puis séparés du sac folliculaire à la main, les ovocytes sont rincés dans une solution de Barth sans calcium (en mM : 90 NaCl ; 3 KCl ; 0,82 MgSO₄ ; 5 HEPES ; pH = 7,6 ajusté avec NaOH, osmolarité de 180 mosm/Kg).

Les ovocytes sont ensuite incubés dans la même solution contenant 2 mg/mL de collagénase et 0,5 mg/mL de d'inhibiteur de trypsine (Sigma-Aldrich, ST-Louis, MO). Les ovocytes sont mis à agiter dans cette solution pendant 60 à 70 minutes afin de détruire la membrane folliculaire. Ils sont ensuite rincés dans une solution de Barth avec calcium (en mM : 90 NaCl ; 3 KCl ; 0,82 MgSO₄ ; 0,41 CaCl₂ ; 0,33 Ca(NO₃)₂ ; 5 HEPES ; pH = 7,6 ajusté avec NaOH, osmolarité de 180 mosm/Kg) à laquelle de l'albumine (1 mg/mL) (Sigma-Aldrich, ST-Louis, MO) est ajoutée. Cette dernière va permettre de neutraliser la collagénase résiduelle.

Les ovocytes sont conservés pendant 5 à 7 jours dans une solution de Barth supplémentée avec des antibiotiques, du sérum (pénicilline (100 U/mL), Streptomycine (100 µg/mL), Kanamycine (10 mg/100mL), Sodium pyruvate (2,5 mM) et Sérum de cheval 5%). Avant leur utilisation, les ovocytes sont incubés dans cette solution pendant quelques heures. Pendant ce temps, la solution à injecter est préparée (10 µL). Elle est composée de 6 µg d'ARNc codant pour le canal muté ou de type sauvage ($Ca_v1.2$), ainsi que les ARNc des sous-unités auxiliaires $Ca_v\beta3$ (3 µg) et $Ca_v\alpha2\delta$ (2 µg). Un volume de 46 nL de ce mélange est injecté dans les ovocytes qui seront incubés à 18°C dans une solution de Barth pendant deux à six jours, selon le délai d'expression des protéines. Dans les cas où nous avons testé les constructions dans le vecteur pCMV-Tag5a, l'ADN a été injecté directement dans le noyau pour ce qui est de la sous-unité $Ca_v\alpha1.2$ (1 µg/µL dont 4,6 nL sont injectés par ovocyte). Les sous-unités auxiliaires $Ca_v\beta3$ et $Ca_v\alpha2\delta$ ont été injectées sous forme d'ARN avec le même protocole qu'indiqué précédemment.

2.6 Enregistrements électrophysiologiques

Les courants macroscopiques sont mesurés par la technique du voltage imposé en double électrode via l'amplificateur OC-725C (Warner instruments, Hamdes, CT). Les deux électrodes en verre finement étirées sont remplies d'une solution contenant en mM : 3000 KCl ; 1 EGTA ; 10 HEPES ; pH = 7,4, dans le but d'obtenir une diffusion minimale lors des manipulations. La première électrode sert à imposer le voltage tandis que la seconde permet d'injecter le courant nécessaire pour maintenir le voltage constant. Le courant qui sera entré dans l'ovocyte de Xénope pourra alors être mesuré indirectement. Pour prévenir l'activation des canaux chlore activés par le calcium intracellulaire, nous injectons dans les ovocytes 46 nL d'une solution d'EGTA 50 mM (50 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH ajusté à 7,3 avec KOH), environ une demi-heure avant le début des expériences.

L'ovocyte est perforé avec les deux électrodes dans une solution contenant (en mM : 96 NaOH ; 2 KOH ; 1,8 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; 1 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; 10 HEPES, pH ajusté à 7,4 avec de l'acide méthane sulfonique (Sigma-Aldrich, ST-Louis, MO)). En utilisant une perfusion par gravité à un débit de 2 mL/min, la solution du bain est changée avec une solution de 10 Ba^{2+} (en mM : 10 $Ba(OH)_2$; 110 NaOH ; 1 KOH ; 10 HEPES ; pH = 7,4 ajusté avec de l'acide méthane sulfonique (Sigma-Aldrich, ST-Louis, MO)). Nous mesurons ainsi les courants macroscopiques en présence de 10 mM barium.

L'acquisition des données se fait avec le logiciel Clampex 8.2 (Molecular Devices, Axon instruments, Foster City, CA), à une fréquence de 5 kHz filtrée à 1 kHz grâce au filtre intégré de l'amplificateur. Le protocole de pulses sert à obtenir la relation courant/voltage (I/V) pour caractériser les paramètres d'activation et les propriétés des cinétiques d'inactivation du canal. À partir d'un potentiel de repos de -80 mV, une série de pulses dépolarisants entre -40 et $+50$ mV (par intervalle de 5 mV) est appliquée durant 900 ms chacune.

L'analyse des données électrophysiologiques a été effectuée par Alexandra Raybaud et le docteur Lucie Parent.

2.7 Statistiques et analyse des données de FACS

Toutes les analyses statistiques ont été effectuées grâce au logiciel Origin. Les données présentées en électrophysiologie et en FACS indiquent toutes les moyennes \pm SEM. De plus, pour toutes les expériences, le même test a été utilisé (Test ANOVA).

Les données de FACS sont obtenues à partir des graphiques indiquant le pourcentage de cellules en fonction de la fluorescence. Deux populations sont déterminées : M1 et M2. La population M1 est obtenue à partir de la mesure de cellules non transfectées non incubées avec l'anticorps anti HA couplé au FITC. Pour toutes les autres mesures, M1 est constante et M2, déterminée à partir de M1, constitue alors la population de cellules fluorescentes.

3 RÉSULTATS

3.1 Résultats préliminaires

3.1.1 La délétion $\Delta C1935$

Les expériences, menées en 2007 par Alexandra RAYBAUD, ont montré que la délétion $\Delta C1935$ pouvait mener à l'expression du canal $Ca_v1.2$ à la membrane plasmique en absence de sous-unité $Ca_v\beta 3$ alors que le canal de type sauvage ne s'exprimait pas en absence de sous-unité $Ca_v\beta 3$ (Figure 14).

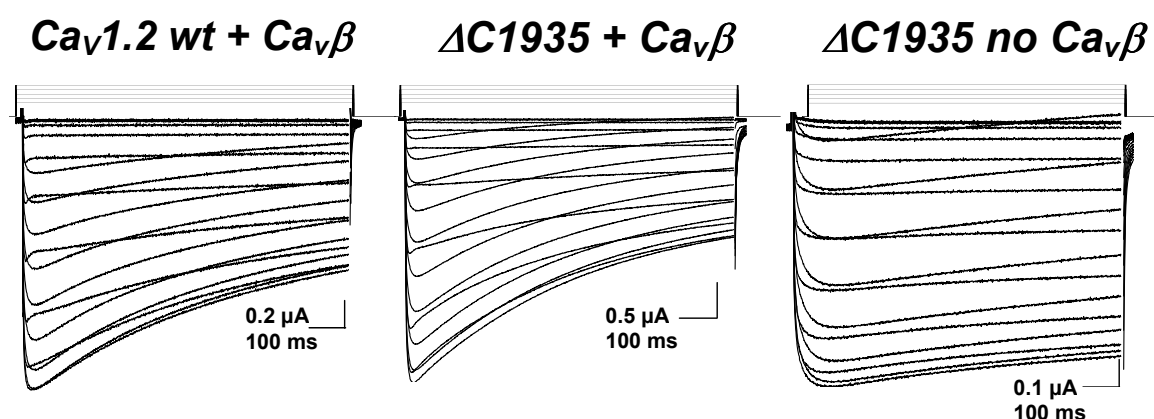


Figure 14. Courants macroscopiques en barium avec la délétion $\Delta C1935$. Les courants macroscopiques ont été enregistrés dans une solution de 10 mM de BaMes. A partir d'un potentiel de repos de -80mV, une série de pulses dépolarisants (de -40 à +50 mV par intervalle de 5mV) a été appliquée (Courants mesurés par Alexandra Raybaud).

Après avoir testé à la fois par analyse de séquençage et par immunobuvardage de type Western (Figure 15), que la mutation était bien présente, notre laboratoire a confirmé, ce qui avait été observé par le groupe de Marlene Hosey en 2001, que les courants sont augmentés après délétion de la partie distale du C-terminal de la sous-unité $Ca_v\alpha 1$ (Figure 16) (Travail effectué par Alexandra Raybaud).

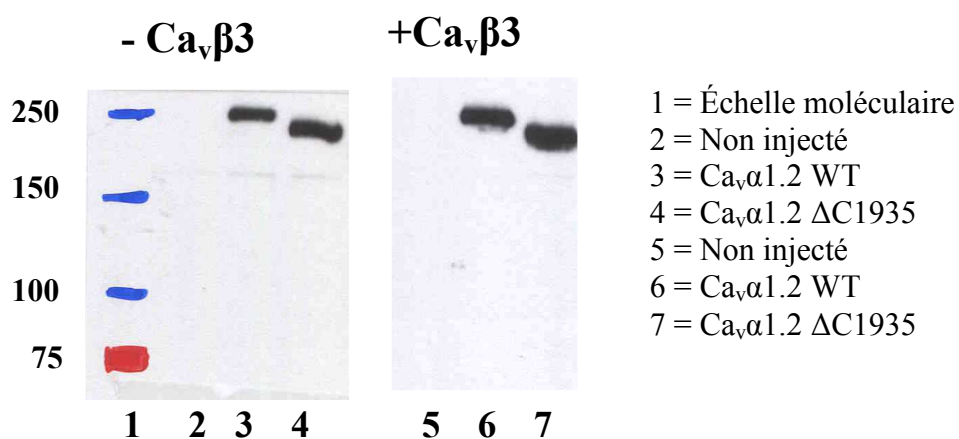


Figure 15. Immunobavardage de type Western montrant la présence de la protéine tronquée en $\Delta C1935$ dans les lysats d'ovocytes de Xénope. La protéine synthétisée est présente au poids moléculaire attendu (243 kDa pour la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$ de type sauvage et 219 pour la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$ tronquée en position 1935) en absence et en présence de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ (Alexandra Raybaud).

Toutefois, il n'a jamais été rapporté dans la littérature, l'expression fonctionnelle de la délétion $\Delta C1935$ en absence de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$. Cette observation est nouvelle et nous permet de confirmer les rôles de la sous-unité auxiliaire sur les propriétés biophysiques du canal $\text{Ca}_v1.2$.

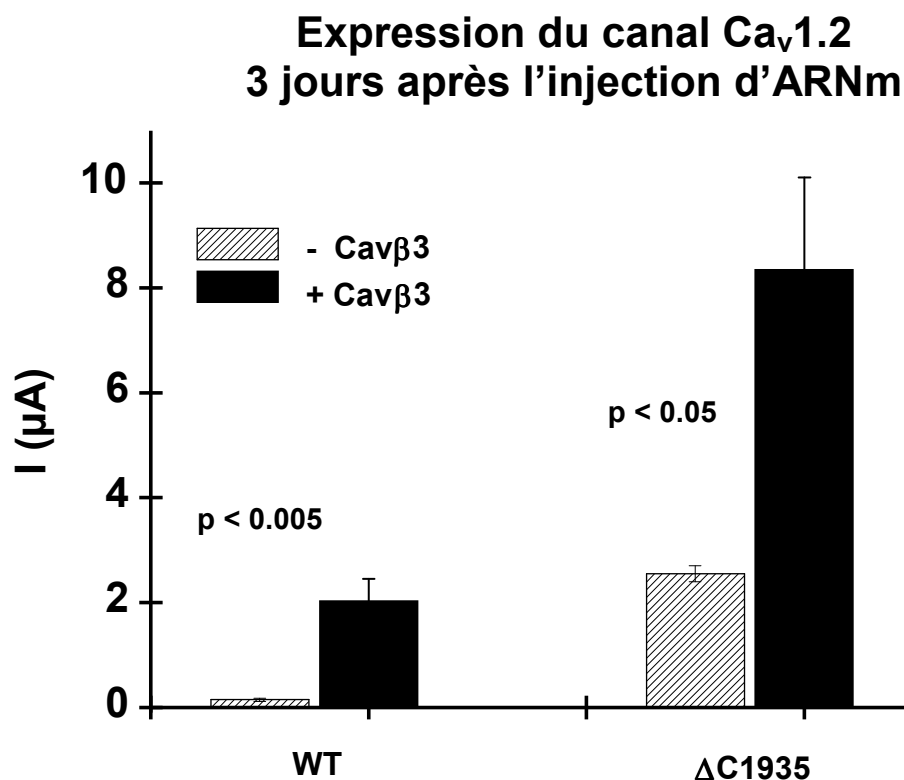


Figure 16. Courants globaux de $\text{Ca}_v1.2$ de type sauvage ou tronqué en position 1935 observés 72h après injection de l'ARN dans les ovocytes de Xénope. La délétion en présence de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ donne des courants macroscopiques plus élevés que le canal de type sauvage (Alexandra Raybaud, Lucie Parent).

Nous pouvons distinguer deux rôles différents de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$. En effet, d'après le Tableau 6, nous pouvons constater que les sous-unités $\text{Ca}_v\beta$ modulent la dépendance de l'activation et de l'inactivation en fonction du voltage.

Concernant l'activation, il est intéressant de voir que la présence de la sous-unité facilite l'ouverture du canal. Le potentiel de mi-activation (potentiel pour lequel le maximum de courant entrant est atteint) est obtenu à -13 ± 1 mV en présence de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ alors qu'il est de $+2 \pm 1$ mV en son absence. Cela montre qu'il faut beaucoup plus d'énergie, sous forme de potentiel électrique, pour amener le canal dans l'état ouvert.

Ca _v 1.2 + Ca _v β3 (10 Ba ²⁺)	Activation		Inactivation
	E _{0.5,act} (mV)	Maximum de courant Barium (μA)	r800 à 10 mV
Canal de type sauvage <i>vecteur pGEM</i>	-7,8 ± 0,4 (127)	-1,7 ± 0,1 (127)	0,50 ± 0,01 (127)
ΔC1935	-13 ± 1 (24)	-2,8 ± 0,7 (24)	0,44 ± 0,02 (24)
ΔC1935 sans β3	2 ± 1 (22)	-1,8 ± 0,2 (27)	0,81 ± 0,01 (27)

Tableau 6. Propriétés biophysiques de la mutation ΔC1935 comparée avec celles du canal de type sauvage. Les mesures ont été faites en présence de 10 mM de barium à partir d'un potentiel de maintien de – 80 mV après expression dans les œufs de Xénope. Les paramètres, E_{0.5,act}, « Maximum de courants en barium » et R800 ont été extraits à partir des données provenant du protocole de pulse I/V. On trouve entre parenthèses le nombre d'enregistrements. Les valeurs du canal de type sauvage ont été analysées par Lucie Parent à partir des données du laboratoire depuis 2007. (Alexandra Raybaud, Sébastien Wall-Lacelle, Florian Le Coz. Les données de la délétion proviennent du travail d'Alexandra Raybaud et Florian Le Coz).

Ensuite, la sous-unité Ca_vβ3 affecte aussi les cinétiques d'inactivation et la dépendance en voltage de cette dernière. L'inactivation est un état pour lequel le canal est ouvert mais les ions ne peuvent passer. Pour pouvoir caractériser cet état, deux analyses sont possibles. Les cinétiques sont estimées à partir de la mesure des courants résiduels observés à 800 ms (r800). Le r800 est calculé en faisant le rapport du courant maximum obtenu lorsque le canal s'ouvre et le courant résiduel à 800 ms. Ainsi, plus le r800 se rapprochera de 1 moins le canal sera inactivé et plus le r800 se rapprochera de 0 plus le canal sera inactivé. La valeur obtenue représente la proportion des canaux qui n'est pas inactivée après 800 ms. Nous remarquons selon le Tableau 6, que la présence de la sous-unité Ca_vβ3 accélère l'inactivation, alors que son absence la ralentit. Pour le canal Ca_v1.2 de type sauvage, le R800 est de 0,50 ± 0,01 et de 0,46 ± 0,02 pour le canal tronqué en 1935. Par contre, la valeur du R800 lorsque la sous-unité Ca_vβ3 est absente est de 0,72 ± 0,01 (n = 7). Nous pouvons conclure que la délétion n'affecte pas les propriétés d'inactivation du canal et que l'effet de la sous-unité Ca_vβ3 devient visible avec la délétion ΔC1935 puisque le canal s'exprime sans sous-unité Ca_vβ3 dans ce cas.

Ceci concorde avec ce que notre laboratoire a observé en 2001 dans le cas de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 2.3$, la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$, en se liant au domaine AID accélère les cinétiques d'inactivation (Berrou, Bernatchez et al. 2001). La délétion ΔC1935 s'exprimant sans la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ dans les œufs de Xénope, nous avons décidé de tester d'autres délétions en C-terminal afin de voir si les effets étaient les mêmes.

3.1.2 Les délétions ΔC2030 , ΔC1856 , ΔC1733 et ΔC1700

Les délétions testées sont les suivantes : ΔC2030 , ΔC1733 , ΔC1856 , ΔC1700 . Toutes se comportent comme le ΔC1935 , c'est-à-dire que les propriétés biophysiques sont les mêmes et chacune montre des courants en absence de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ (Tableau 7). L'expression de la délétion en position 1700 ne montre cependant aucun courant.

La délétion ΔC1700 n'a montré aucun courant dans les ovocytes de Xénope en présence et en absence de sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$ (Benoîte Bourdin, Immunobuvardage de type Western effectué à partir de membranes totales).

Dans les ovocytes de Xénope, la délétion du C-terminal ne gêne pas l'expression fonctionnelle du canal et permet même la mesure de courants macroscopiques en absence de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$. Notre hypothèse est révisée. Un signal de rétention au niveau du réticulum endoplasmique serait présent sur le domaine C-terminal du canal après la position 1700. Nos expériences préliminaires ont été effectuées dans les ovocytes de Xénope, organisme batracien. Pour l'expression dans un système d'expression de mammifère, les cellules HEK293T, provenant de cellules embryonnaires de rein humain seront utilisées. L'effet des délétions sur l'expression de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ pourra ainsi être vérifié dans des conditions se rapprochant davantage des conditions physiologiques.

Ca _v 1.2 + Ca _v β3 (10 Ba ²⁺)	Activation		Inactivation
	E _{0.5,act} (mV)	Pic de courant IBa (μA)	r800 à 10 mV
Canal de type sauvage <i>Vecteur pGEM</i>	-7,8 ± 0,4 (127)	-1,7 ± 0,1 (127)	0,50 ± 0,01 (127)
ΔC2030	-14 ± 1 (13)	-1,8 ± 0,3 (13)	0,46 ± 0,08 (13)
ΔC2030 sans β3	1 ± 1 (28)	-0,9 ± 0,1 (28)	0,81 ± 0,01 (28)
ΔC1856	-4,9 ± 0,4 (12)	-1,1 ± 0,2 (12)	0,58 ± 0,02 (12)
ΔC1856 sans β3	+4,3 ± 0,5 (8)	-0,43 ± 0,05 (8)	0,80 ± 0,01 (8)
ΔC1733	-8 ± 2 (8)	-2,9 ± 0,3 (8)	0,55 ± 0,04 (8)
ΔC1733 sans β3	+8 ± 1 (5)	-1,0 ± 0,1 (5)	0,88 ± 0,01 (5)

Tableau 7. Propriétés biophysiques du canal Ca_v1.2 tronqué en position 2030, 1856 et 1733 comparé avec le canal Ca_v1.2 de type sauvage. Les mesures ont été faites en présence de 10 mM de Barium à partir d'un potentiel de maintien de – 80 mV après expression dans les œufs de Xénope. Les paramètres, E_{0.5,act}, « Maximum de courants en barium » et R800 ont été extraits à partir des données provenant du protocole de pulse I/V. On trouve entre parenthèses le nombre d'enregistrements. Les valeurs du canal de type sauvage ont été analysées par Lucie Parent à partir des données du laboratoire depuis 2007. (Alexandra Raybaud, Sébastien Wall-Lacelle, Florian Le Coz. Les données des délétions proviennent du travail d'Alexandra Raybaud et Florian Le Coz).

3.2 L'expression dans les cellules

Les constructions ayant été effectuées dans le vecteur pGEM ne possédant pas de promoteur CMV, il a fallu sous-cloner l'ADN de la sous-unité Ca_vα1 de Ca_v1.2 dans un vecteur approprié. Nous avons testé l'ADN du canal en immunobuvardage de type Western de Ca_v1.2 dans les vecteurs pRC-CMV et pGW1H que nous avons reçus de deux chercheurs différents. La première construction que nous avons vérifiée a été celle du vecteur pRC-CMV. Nous avons pu constater que le canal était bien présent et au poids moléculaire attendu (Figure 17).

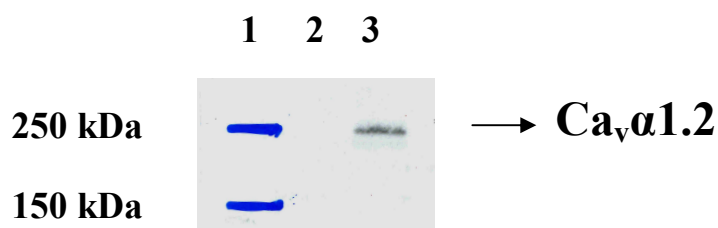


Figure 17 : Expression de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ dans le vecteur pRC-CMV transfecté dans les cellules HEK293T en immunobuvardage de type Western. Piste 1: Echelle. Piste 2 : Lysats de cellules HEK293T non transfectées. Piste 3 : Lysats de cellules transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ dans le vecteur pRC-CMV (poids moléculaire attendu est de 243 kDa).

Afin de voir laquelle des deux constructions est la meilleure (à la fois au niveau de la qualité de l'immunobuvardage de type Western mais aussi au niveau du taux d'expression de la protéine), nous avons aussi testé $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ dans le vecteur pGW1H. Malheureusement, le test a révélé que la protéine n'était pas présente (Figure 18). Alexandra Raybaud, M.Sc a aussi effectué le test et obtenu le même résultat. La piste 5 sert de contrôle afin de voir, d'une part, si le canal est au bon poids moléculaire et, d'autre part, si l'anticorps fonctionne de manière adéquate. D'après cette constatation, nous en sommes venus à la conclusion que la construction de $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ dans le vecteur pRC-CMV était la plus appropriée.

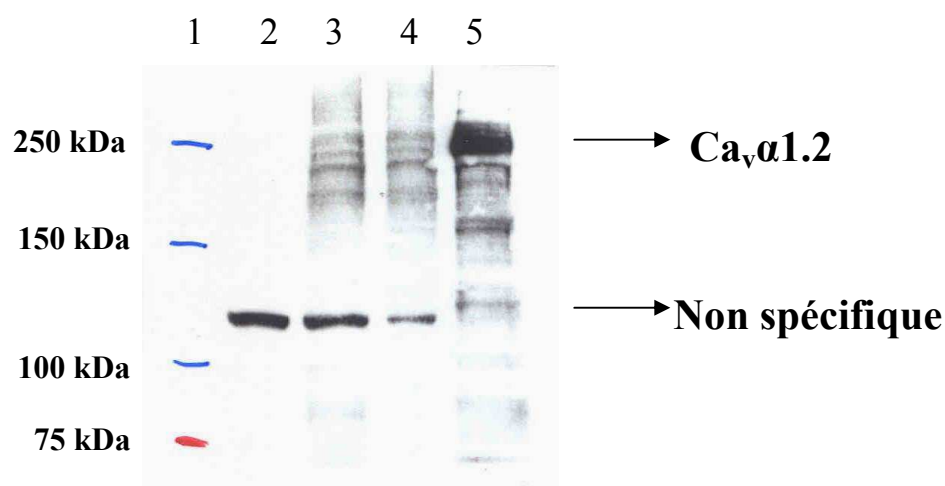


Figure 18. Expression de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ (vecteur pGW1H) transfectée dans les cellules HEKT en immunobavardage de type Western. Piste 1 : Echelle. Piste 2 : Lysat de cellules HEKT non transfectées. Piste 3 : Lysat de cellules HEKT transfectées avec $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ dans le vecteur pGW1H (50 μg de protéines ont été chargées). Piste 4 : Lysat de cellules HEKT transfectées avec $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ dans le vecteur pGW1H (20 μg de protéines ont été chargées). Piste 5 : Lysats d'ovocytes injectés avec de l'ARN $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ après 3 jours d'expression. L'immunobuvardage de type Western surexposé montre pour les puits 3 et 4 plusieurs bandes peu nettes qui mènent à penser que la protéine est dégradée. Le profil 5 montre $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ au poids moléculaire attendu (243 kDa).

3.2.1 L'insertion de l'étiquette HA

Pour la suite des expériences, nous avons choisi d'utiliser l'étiquette HA de petite taille (9 acides aminés : YPYDVPDYA) pour minimiser les changements structuraux. Comme le canal $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ est exprimé à la membrane dans les œufs de Xénope en absence de sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$, nous avons voulu quantifier l'expression du canal à la membrane dans différentes conditions.

La technique de FACS utilise un laser qui balaie les cellules et qui détecte ensuite la fluorescence réémise par un anticorps couplé à un fluorophore. Il faut par conséquent un épitope extracellulaire qui soit reconnu par un anticorps afin de pouvoir détecter les canaux à la membrane de la cellule intacte.

Afin d'obtenir ce cas de figure, nous avons choisi d'utiliser l'épitope HA (de l'hémagglutinine). Nous avons inséré la séquence HA au niveau du domaine I du canal dans la boucle extracellulaire entre les segments S1 et S2 (entre l'acide aminé sérine 182 et l'asparagine 183). Nous avons choisi cette position parce que cette boucle est éloignée du pore du canal (segments 5 et 6, après le segment 4, senseur du voltage sur la Figure 2) tout en évitant de supprimer des sites de glycosylation (Figure 19).

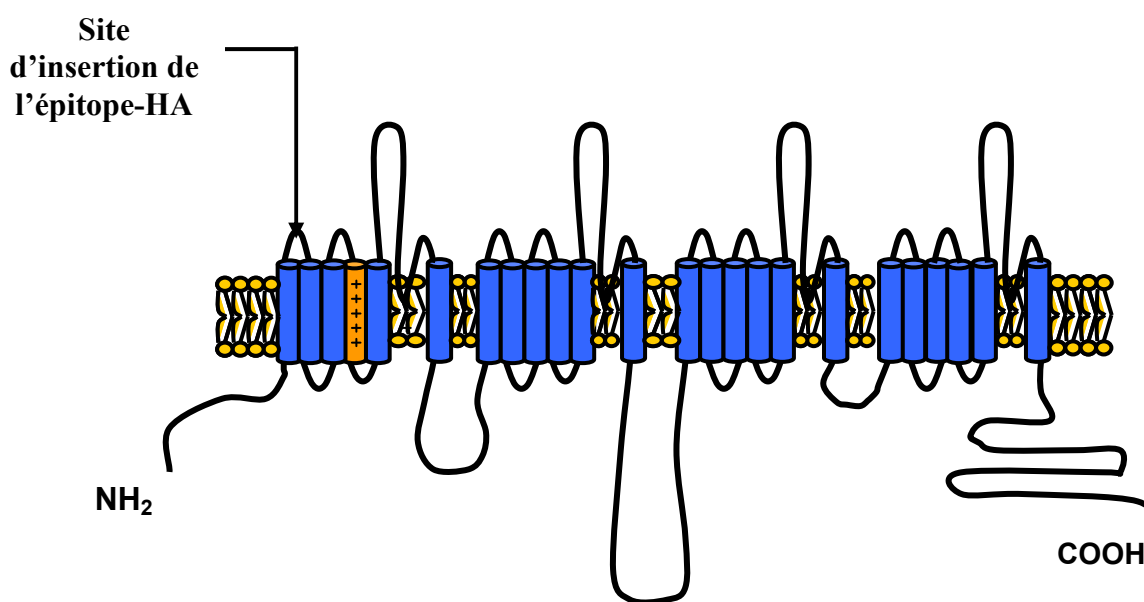


Figure 19. Structure secondaire prédite de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$ du canal $\text{Ca}_v1.2$ montrant le site d'insertion de l'épitope HA. Le segment orange indique le segment 4, senseur du voltage, que l'on retrouve dans chacun des quatre domaines constituant la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1$ du canal $\text{Ca}_v1.2$ (Figure 2).

Nos tentatives d'insérer dans pRC-CMV l'épitope HA par mutagénèse ont échoué même après plusieurs tentatives et en utilisant différentes stratégies. L'insertion de l'épitope HA a toutefois été effectuée préalablement avec succès par Alexandra Raybaud, M.Sc, dans la construction de $\text{Ca}_v1.2$ dans le vecteur pGEM. Nous avons révisé notre stratégie et nous avons décidé de sous-cloner le canal $\text{Ca}_v1.2$ du vecteur pGEM vers le vecteur pCMV-Tag5a.

Pour se faire, le sous-clonage de $Ca_v1.2$ a été effectué en utilisant les enzymes de restriction EcoRI et HindIII après suppression du site EcoRI en créant la mutation N739N, silencieuse (dont la fonction a été testée). Après que l'extinction du site EcoRI interne de la sous-unité $Ca_v\alpha1$ de $Ca_v1.2$ eut été effectuée, le docteur Hélène Klein a effectué le sous-clonage de la sous-unité $Ca_v\alpha1$ (sauvage et étiquetée HA) de $Ca_v1.2$ du vecteur d'expression pGEM vers le vecteur pCMV-Tag5a.

3.2.2 Vérifications de la validité des constructions par immunobuvardage de type Western et par électrophysiologie

Les propriétés biophysiques des constructions ont été vérifiées par électrophysiologie (Tableau 8) et par la méthode d'immunobuvardage de type Western après expression dans les cellules HEKT (Figure 20).

3.2.2.1 Le canal calcique $Ca_v1.2$ -HA « pleine longueur »

Des courants ayant été observés en électrophysiologie, ceci montre que la protéine est belle et bien synthétisée dans les ovocytes, après injection en ADN. De plus, la Figure 20 confirme l'expression de la protéine dans les cellules. Nous remarquons aussi que l'insertion de l'épitope HA modifie un peu les propriétés biophysiques du canal de type sauvage mais de manière non significative, que ce soit à la fois dans le vecteur pGEM (injection en ARN) ou dans le vecteur pCMV-Tag5a (injection en ADN) (Tableau 8).

Ca_v1.2 + Ca_vβ3 (10 Ba²⁺)	Activation		Inactivation
	E_{0.5,act} (mV)	Maximum des courants en Barium (μA)	r800 à 10 mV
Canal de type sauvage <i>Vecteur pGEM</i>	-7,8 ± 0,4 (127)	-1,7 ± 0,1 (127)	0,50 ± 0,01 (127)
Canal de type sauvage <i>Vecteur pCMV-Tag5a</i>	-10 ± 1 (17)	-2,6 ± 0,3 (17)	0,46 ± 0,02 (17)
Ca_v1.2 (HA) <i>Vecteur pGEM</i>	-3,3 ± 0,5 (15)	-2,0 ± 0,1 (15)	0,61 ± 0,01 (15)
Ca_v1.2 (HA) <i>Vecteur pCMVTag5a</i>	-3,7 ± 0,5 (21)	-1,3 ± 0,2 (21) <i>jours 5-7</i>	0,60 ± 0,01 (21)

Tableau 8. Tableau comparatif des propriétés biophysiques de la sous-unité Ca_vα1 du canal Ca_v1.2 avec et sans l'épitope HA. Les mesures ont été faites en présence de 10 mM de barium à partir d'un potentiel test de maintien de – 80 mV après expression dans les œufs de Xénope. Les paramètres, E_{0.5,act}, « Maximum de courants en barium » et R800 ont été extraits à partir des données provenant du protocole de pulse I/V. On trouve entre parenthèses le nombre d'enregistrements. Les valeurs numériques ont été analysées par Lucie Parent à partir des données du laboratoire depuis 2007 (Alexandra Raybaud, Sébastien Wall-Lacelle et Florian Le Coz). Les tests effectués sur le canal Ca_v1.2-HA ont été obtenus par Alexandra Raybaud. Les expériences obtenues dans le cas du canal de type sauvage et marqué HA dans le vecteur pCMV-Tag5a ont été réalisées par Florian Le Coz.

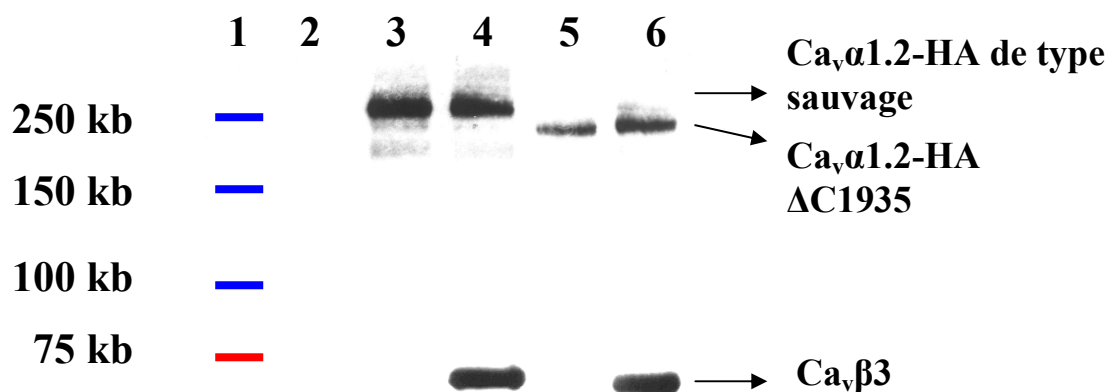


Figure 20. Immunobavardage de type Western mettant en évidence la synthèse de la sous-unité $\text{Ca}_v1.2$ avec et sans la délétion ΔC1935 en présence ou non de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta3$. Piste 1 : Échelle Piste 2 : Lysat de cellules HEKT non transfectées Piste 3 : Lysat de cellules HEKT transfectées avec $\text{Ca}_v\alpha1.2$ de type sauvage Piste 4 : Lysat de cellules HEKT- $\text{Ca}_v\beta3$ stables transfectées avec la $\text{Ca}_v\alpha1.2$ de type sauvage Piste 5 : Lysat de cellules HEKT transfectées avec $\text{Ca}_v\alpha1.2\text{-}\Delta\text{C1935}$ Piste 6 : Lysat de cellules HEKT- $\text{Ca}_v\beta3$ stables transfectées avec $\text{Ca}_v\alpha1.2\text{-}\Delta\text{C1935}$. On note la différence de poids moléculaire entre la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha1.2$ de type sauvage marqué HA (poids moléculaire attendu à 243 kDa) et la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha1.2$ tronquée en position 1935 marqué HA (poids moléculaire attendu à 219 kDa). La figure montre deux gels différents, l'un étant un gel révélé avec l'anticorps primaire anti-HA, l'autre avec un anticorps primaire anti $\text{Ca}_v\beta3$. L'échelle de cette figure a été redessinée en fonction de l'échelle de poids moléculaire située plus loin sur les gels (un gel anti HA et un gel anti $\text{Ca}_v\beta3$), le reste du gel ayant été coupé.

3.2.2.2 La délétion ΔC1935

Nous avons ensuite procédé aux délétions en C-terminal de la protéine. Nous avons commencé par la délétion ΔC1935 . La Figure 20 montre l'expression de la délétion dans les cellules. On remarque bien la différence de poids moléculaire entre le canal de type sauvage et celui tronqué en position 1935. La protéine est bien synthétisée et au bon poids moléculaire dans les cellules HEKT. Nous avons ensuite testé cette construction dans les ovocytes de Xénope après injection d'ADN de la sous-unité $\text{Ca}_v1.2\text{-}\Delta\text{C1935}$.

Ca_v1.2 + Ca_vβ3 (10 Ba²⁺)	Activation		Inactivation
	E_{0.5,act} (mV)	Maximum de courant en Barium (μA)	r800 à 10 mV
Ca_v1.2 (HA) <i>vecteur pCMV-Tag5a</i>	-3,7 ± 0,5 (21)	-1,3 ± 0,2 (21) <i>jours 5-7</i>	0,60 ± 0,01 (21)
Ca_v1.2 (HA) sans β3 <i>vecteur pCMV-Tag5a</i>	+3,9 ± 0,1 (3)	-0,10 ± 0,03 (10) -0,25 ± 0,05 (3) <i>jour 7</i>	n.d
Ca_v1.2 (HA) ΔC1935 <i>vecteur pCMV-Tag5a</i>	-4,3 ± 0,5 (18)	-1,6 ± 0,2 (18) <i>jours 5-7</i>	0,52 ± 0,02 (18)
Ca_v1.2 (HA) ΔC1935 sans β3 <i>vecteur pCMV-Tag5a</i>	3 ± 1 (12)	-0,49 ± 0,09 (12) <i>jours 5-7</i>	0,81 ± 0,02 (12)

Tableau 9. Tableau comparatif des propriétés biophysiques de la sous-unité Ca_vα1 (sauvage-HA et tronqué en position ΔC1935) de Ca_v1.2 dans le vecteur pCMV-Tag5. Les mesures ont été faites en présence de 10 mM de BaMes à partir d'un potentiel de maintien de - 80 mV après expression dans les œufs de Xénope. Les paramètres, E_{0.5,act}, « Maximum de courants en barium » et R800 ont été extraits à partir des données provenant du protocole de pulse I/V. On trouve entre parenthèses le nombre d'enregistrements et n.d = non déterminé. Les valeurs du canal de type sauvage ont été analysées par Lucie Parent à partir des données du laboratoire depuis 2007. Tous les enregistrements des canaux Ca_vα1 de Ca_v1.2 dans le vecteur pCMV-Tag5a ont été obtenus par Florian Le Coz.

La présence de la sous-unité auxiliaire Ca_vβ3 déplace le potentiel de mi-activation vers des potentiels plus négatifs (- 6 mV), ce qui montre que cette dernière facilite l'activation du canal. Cet effet est conservé pour la version sauvage et pour la délétion ΔC1935. Les cinétiques d'inactivation sont plus rapides en présence de la sous-unité Ca_vβ3, ce qui a été démontré dans notre laboratoire pour l'isoforme Ca_v2.3 (Parent, Schneider et al. 1997; Berrou, Bernatchez et al. 2001; Berrou, Klein et al. 2002; Berrou, Dodier et al. 2005). Les courants maximum obtenus après expression de la délétion en position 1935 sur le canal introduit dans le vecteur pCMV-Tag5a sont plus faibles que pour la construction équivalente dans pGEM. Ceci est peut-être dû au fait que l'épitope HA perturbe la synthèse de la protéine. Il se peut que les protéines obtenues après injection d'ARNm (vecteur pGEM) soient plus stables car le vecteur pGEM possède des séquences polyA et des régions non traduites reconnues par l'ovocyte de Xénope.

3.2.2.3 Les délétions $\Delta C1856$ et $\Delta C1733$:

L'expression des constructions suivantes ont été testées : $Ca_v1.2-\Delta C1856$ et $Ca_v1.2-\Delta C1733$ (Figure 21). Dans les cellules HEKT, la différence de poids moléculaire est bien visible et les protéines migrent au poids moléculaire attendu (la délétion $\Delta C1856$ est attendue à 210 kDa et la délétion $\Delta C1733$ à 197 kDa). La faible visibilité de la piste 3 peut s'expliquer par un transfert mal effectué sur la membrane de cellulose.

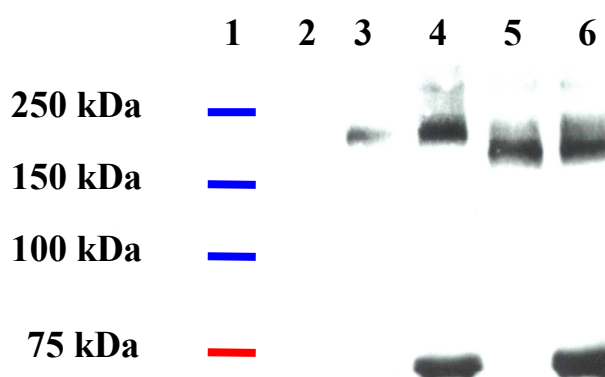


Figure 21. Immunobavardage de type Western mettant en évidence la synthèse de la sous-unité $Ca_v\alpha1$ du canal $Ca_v1.2$ avec les délétions $\Delta C1856$ et $\Delta C1733$ en présence ou en absence de la sous-unité $Ca_v\beta3$. Piste 1 : Echelle. Piste 2 : Lysat de cellules HEKT non transfectées. Piste 3 : Lysat de cellules HEKT transfectées avec la sous-unité $Ca_v1.2-\Delta C1856$. Piste 4 : Lysat de cellules HEKT- $Ca_v\beta3$ stables transfectées avec la sous-unité $Ca_v1.2-\Delta C1856$ Piste 5 : Lysat de cellules HEKT transfectées avec la sous-unité $Ca_v1.2-\Delta C1733$ Piste 6 : Lysat de cellules HEKT- $Ca_v\beta3$ stables (Yolaine Dodier, M.Sc) transfectées avec la sous-unité $Ca_v1.2-\Delta C1733$. La figure montre deux gels différents, l'un étant un gel révélé avec l'anticorps primaire anti-HA, l'autre avec un anticorps primaire anti $Ca_v\beta3$. Les deux gels ont été collés et l'échelle redessinée en fonction des échelles originales présentes plus loin sur les gels originaux.

Le Tableau 10 résume les propriétés électrophysiologiques des différentes expériences effectuées avec les différents mutants dans différentes conditions.

Ca_v1.2 + Ca_vβ3 (10 Ba²⁺)	Activation		Inactivation
	E_{0.5,act} (mV)	Pic de courant IBa (μA)	r800 à 10 mV
Canal de type sauvage <i>ARNm</i>	-7,8 ± 0,4 (129)	-1,7 ± 0,1 (129)	0,50 ± 0,01 (129)
Canal de type sauvage <i>ADN</i>	-10 ± 1 (17)	-2,6 ± 0,3 (17)	0,46 ± 0,02 (17)
Canal de type sauvage sans β3 <i>ADN</i>	5 ± 2 (9)	-0,12 ± 0,02 (9)	n.d.
Ca_v1.2 (HA) <i>ARNm</i>	-3,3 ± 0,5 (15)	-2,0 ± 0,1 (15)	0,61 ± 0,01 (15)
Ca_v1.2 (HA) <i>ADN</i>	-3,7 ± 0,5 (21)	-1,3 ± 0,2 (21) <i>jours 5-7</i>	0,60 ± 0,01 (21)
Ca_v1.2 (HA) sans β3 <i>ADN</i>	+3,9 ± 0,1 (3)	-0,10 ± 0,03 (10) -0,25 ± 0,05 (3) <i>jour 7</i>	n.d.
Ca_v1.2 ΔC1935 <i>ADN</i>	-10 ± 1 (19)	-2,2 ± 0,4 (19) <i>jour 5</i>	0,44 ± 0,02 (19)
Ca_v1.2 ΔC1935 sans β3 <i>ADN</i>	2 ± 1 (14)	-0,5 ± 0,1 (14) 9 ovocytes < 0,05 μA <i>jours 5-6</i>	0,71 ± 0,04 (11)
Ca_v1.2 (HA) ΔC1935 <i>ADN</i>	-4,3 ± 0,5 (18)	-1,6 ± 0,2 (18) <i>jours 5-7</i>	0,52 ± 0,02 (18)
Ca_v1.2 (HA) ΔC1935 sans β3 <i>ADN</i>	3 ± 1 (12)	-0,49 ± 0,09 (12) <i>jours 5-7</i>	0,81 ± 0,02 (12)
Ca_v1.2 ΔC1935 <i>ARNm</i>	-13 ± 1 (24)	-2,8 ± 0,7 (24)	0,44 ± 0,02 (24)
Ca_v1.2 ΔC1935 sans β3 <i>ARNm</i>	2 ± 1 (22)	-1,8 ± 0,2 (27)	0,81 ± 0,01 (27)

Tableau 10 Tableau comparatif des propriétés biophysiques de la sous-unité Ca_vα1 (sauvage, sauvage-HA, tronquée en position ΔC1935, tronquée en position ΔC1935-HA) de Ca_v1.2 dans les vecteurs pCMV-Tag5 et pGEM en présence ou en absence de la sous-unité auxiliaire Ca_vβ3. L'ARNm a été injecté dans les ovocytes de Xénope et les mesures électrophysiologiques ont été effectuées 2 à 4 jours après injection. L'ADN a été injecté directement dans le noyau et les mesures ont été effectuées 5 à 7 jours après injection. Les mesures ont été faites en présence de 10 mM de BaMes à partir d'un potentiel de maintien de - 80 mV après expression dans les œufs de Xénope. Les paramètres, E_{0.5,act}, « Maximum de courants en barium » et R800 ont été extraits à partir des données provenant du protocole de pulse I/V. On trouve entre parenthèses le nombre d'enregistrements et n.d.= non déterminé.

Les valeurs du canal « pleine longueur » ont été analysées par Lucie Parent à partir des données obtenues au laboratoire depuis 2007 (Alexandra Raybaud, Sébastien Wall-Lacelle, Florian Le Coz. Les données des délétions dans pGEM proviennent du travail d’Alexandra Raybaud et Florian Le Coz. Les données obtenues à partir des constructions du vecteur pCMV-Tag5a proviennent du travail de Florian Le Coz).

3.3 Expériences de FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)

La méthode de la cytométrie de flux a été utilisée pour détecter la présence de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ à la membrane plasmique de la cellule et ainsi pouvoir en quantifier son expression à la membrane. Nous avons utilisé dans notre cas des cellules HEKT intactes qui étaient marquées avec l’anticorps anti HA couplé au FITC (molécule qui émet une lumière d’une longueur d’onde de 518 nm (lumière verte)), ce qui a permis de détecter un signal fluorescent qui est proportionnel à la quantité de cellules exposant la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA à la membrane plasmique. La sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ étant étiquetée HA, nous avons utilisé les notations $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA « pleine longueur » ou $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA ΔCX (X étant la position de la délétion).

3.3.1 Le canal calcique $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA « pleine longueur »

Les Figures 22, 24, 26 et 28 montrent en ordonnées le pourcentage de cellules fluorescentes et en abscisse le paramètre FL1-H. Ce paramètre exprime la fluorescence relative, il n’y a donc pas d’unités pour le paramètre FL1-H. Avant chaque début d’expérience, l’appareil de FACS était calibré avec un contrôle négatif (cellules HEKT sauvages sans anticorps) et tous les autres échantillons étaient lus avec la même sensibilité et les mêmes ajustements que le témoin. De plus, FL1-H a permis de détecter (avec le filtre 530/30) l’émission verte (correspondant à la fluorescence émise par le FITC). La population M1 représente le signal d’autofluorescence des cellules, c'est-à-dire la fluorescence intrinsèque des cellules.

La population M2 regroupe les cellules qui émettent de la fluorescence spécifique à la longueur d'onde du FITC (518 nm), molécule couplée à l'anticorps dirigé contre l'épitope HA. Le signal M2 a été utilisé pour calculer le nombre de protéines $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA}$ à la membrane plasmique. Cependant, pour que l'expérience soit valide, il faut s'assurer que les membranes plasmiques soient intactes et que l'anticorps couplé au FITC ne peut pénétrer dans la cellule.

La Figure 22 montre une population de cellules composant la population M2 qui apparaît dans le cas où la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ est présente (pour une valeur de la FL1-H comprise entre 10^1 et 10^2). On remarque que l'augmentation de fluorescence par rapport au témoin est faible mais significative ($p < 0,001$) $6 \pm 1 \%$ ($n = 3$), dans le cas où la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ est absente. Ceci indique que ces cellules ne portent peu ou pas l'épitope HA à leur surface et que la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA}$ « pleine longueur » n'est que peu ou pas exprimée à la membrane plasmique. Les cellules composant la population M2 sont fluorescentes et portent l'épitope HA, ce qui laisse sous-entendre que la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA}$ « pleine longueur » est exprimée à la membrane plasmique lorsque la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$ est présente.

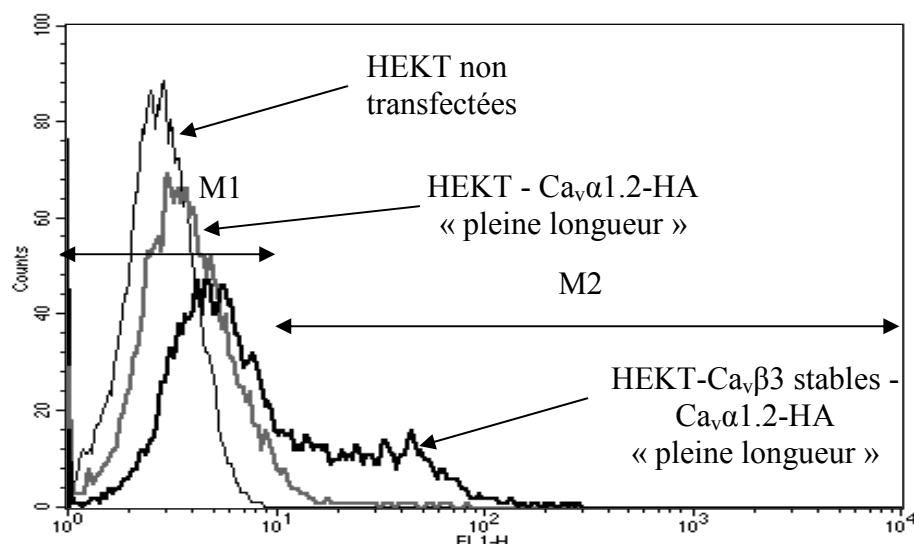


Figure 22. Résultats d'une expérience de FACS montrant la fluorescence des cellules HEKT transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA}$ « pleine longueur » en présence ou en absence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$. Le trait noir fin montre les cellules HEKT non transfectées incubées avec l'anticorps anti HA couplé au FITC. Le trait gris épais montre les cellules HEKT transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA}$ « pleine longueur ». Le trait noir épais montre les cellules HEKT- $\text{Ca}_v\beta 3$ stables transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA}$ « pleine longueur ». L'axe des ordonnées représente le pourcentage de cellules détectées selon le signal fluorescent exprimé en abscisse (Données obtenues à partir d'une expérience unique).

La Figure 23 représente la somme de trois expériences indépendantes dans lesquelles le signal fluorescent est quantifié. Environ $0,2 \pm 0,1\%$ ($n=3$) des cellules témoins (cellules HEKT mesurées en absence de toute sous-unité du canal $\text{Ca}_v 1.2$) émettent de la fluorescence. C'est le signal utilisé pour ajuster la valeur de M1 (autofluorescence intrinsèque des cellules). Le nombre de cellules fluorescentes augmente significativement ($p<0,001$) à $6 \pm 1\%$ ($n=3$) lorsque la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ étiquetée HA est exprimée seule en absence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$ (deuxième colonne de la Figure 23). Cependant, une augmentation significative du nombre de cellules fluorescentes ($29 \pm 4\%$) est observée ($p<0,001$ par rapport à l'absence de sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$) lorsque la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA}$ est co-exprimée dans les cellules stables $\text{Ca}_v\beta 3$ (troisième colonne). Ces résultats suggèrent que la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA}$ migre à la membrane même légèrement en absence de sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ et que la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$ permet de quintupler le nombre de protéines fluorescentes.

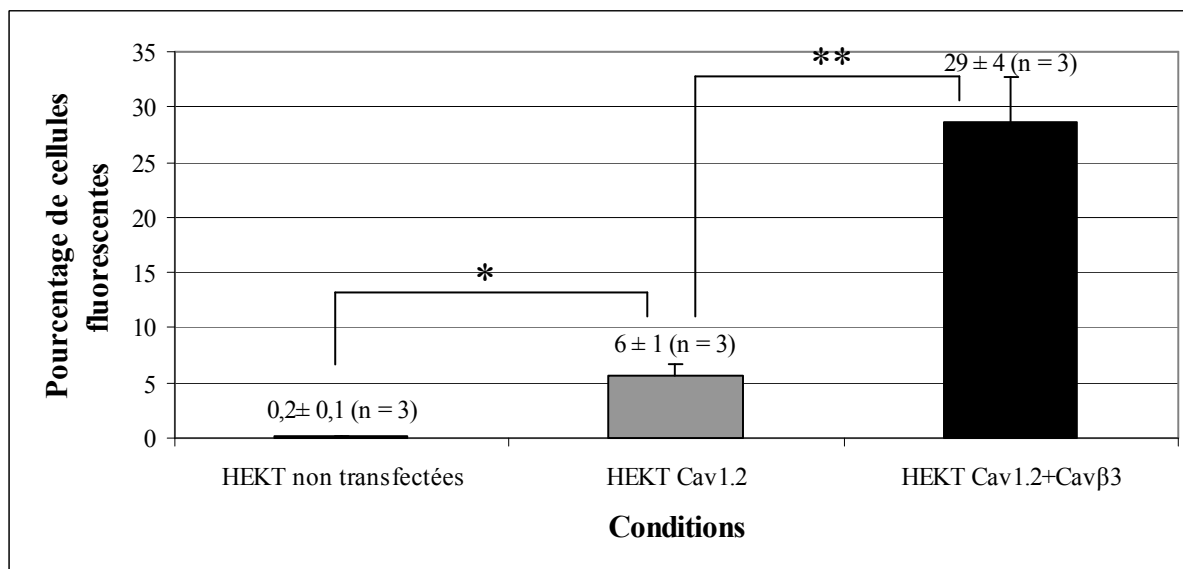


Figure 23. Histogramme comparant le nombre de cellules fluorescentes mesurées en condition témoin (HEK non transfectées) avec le nombre de cellules fluorescentes transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA}$ « pleine longueur » mesuré en présence et en absence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$. Le signal fluorescent mesuré sur les cellules entières est plus élevé lorsque la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA}$ « pleine longueur » est exprimée en présence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$. Les valeurs sont obtenues en faisant la moyenne des valeurs de trois expériences distinctes (trois séries de mesures distinctes à des jours différents sur des cellules différentes transfectées indépendamment). Les astérisques indiquent les différences significatives qu'il existe entre les différentes expériences (* entre les HEKT non transfectées et les HEKT transfectées avec $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA}$ « pleine longueur », ** entre les HEKT transfectées avec $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA}$ « pleine longueur » en présence ou non de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$).

3.3.2 Le canal calcique $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA}$ tronqué en position 1935

Il a ensuite fallu mener les expériences en présence de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA}$ tronquée en C-terminal afin de comparer les résultats avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA}$ « pleine longueur ». Nos résultats préliminaires dans les ovocytes suggèrent que la délétion ΔC1935 est exprimée à la membrane en absence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$.

La Figure 24 montre une population de cellule composant la population M2 qui apparaît dans le cas où la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ est présente (pour une valeur de la FL1-H comprise entre 10^1 et 10^2). On remarque, encore, comme il a été observé dans le cas de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA}$ « pleine longueur », que l'augmentation de fluorescence par rapport au témoin est faible mais significative ($p < 0,001$) $5 \pm 1 \%$ ($n = 3$), dans le cas où la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ est absente. Ceci indique que ces cellules ne portent peu ou pas l'épitope HA à leur surface et donc que la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1935}$ n'est que peu ou pas exprimée à la membrane plasmique. Il n'y a pas de différence significative d'intensité de fluorescence entre les cellules transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA}$ « pleine longueur » et celles exprimées la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1935}$ toutes deux exprimées en absence de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$. Cette constatation diffère de ce que nous avons observé dans les ovocytes de Xénope, puisque nous avons observé des courants calciques lorsque la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1935}$ avait été exprimée dans les ovocytes de Xénope en absence de sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$, ce qui avait montré que la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1935}$ se trouvait à la membrane plasmique. Les cellules composant la population M2 sont fluorescentes et portent l'épitope HA, ce qui laisse sous-entendre que la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1935}$ est exprimée à la membrane plasmique lorsque la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$ est présente.

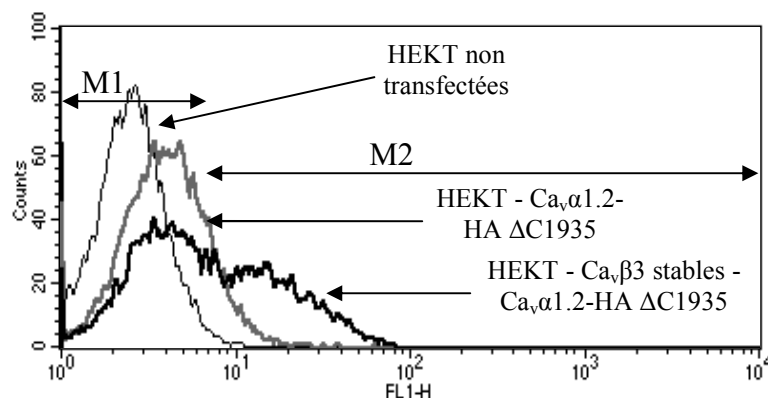


Figure 24. Résultats d’une expérience de FACS montrant la fluorescence des cellules HEKT transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1935}$ en présence ou en absence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$. Le trait noir fin montre les cellules HEKT non transfectées incubées avec l’anticorps anti HA couplé au FITC. Le trait gris épais montre les cellules HEKT transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1935}$. Le trait noir épais montre les cellules HEKT- $\text{Ca}_v\beta 3$ stables transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1935}$. L’axe des ordonnées représente le pourcentage de cellules détectées selon le signal fluorescent exprimé en abscisse (données obtenues à partir d’une expérience unique).

Le nombre de cellules fluorescentes mesuré pour la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1935}$ exprimée seule en absence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$ n’est pas significativement différent ($p > 0,2$) de ce qui est mesuré pour la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ étiquetée HA exprimée seule en absence de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$. Le nombre de cellules fluorescentes mesuré pour la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ étiquetée HA ΔC1935 augmente quand elle est co-exprimée avec la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$ ($30 \pm 2 \%$ $n=2$) mais le pourcentage de cellules fluorescentes n’est pas significativement différent ($p > 0,2$) de ce qui a été observé pour $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA}$ « pleine longueur ». Ces résultats suggèrent que l’adressage à la membrane de la construction ΔC1935 est similaire au canal « pleine longueur » et que ΔC1935 répond de la même manière à la modulation par la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ (Figure 25).

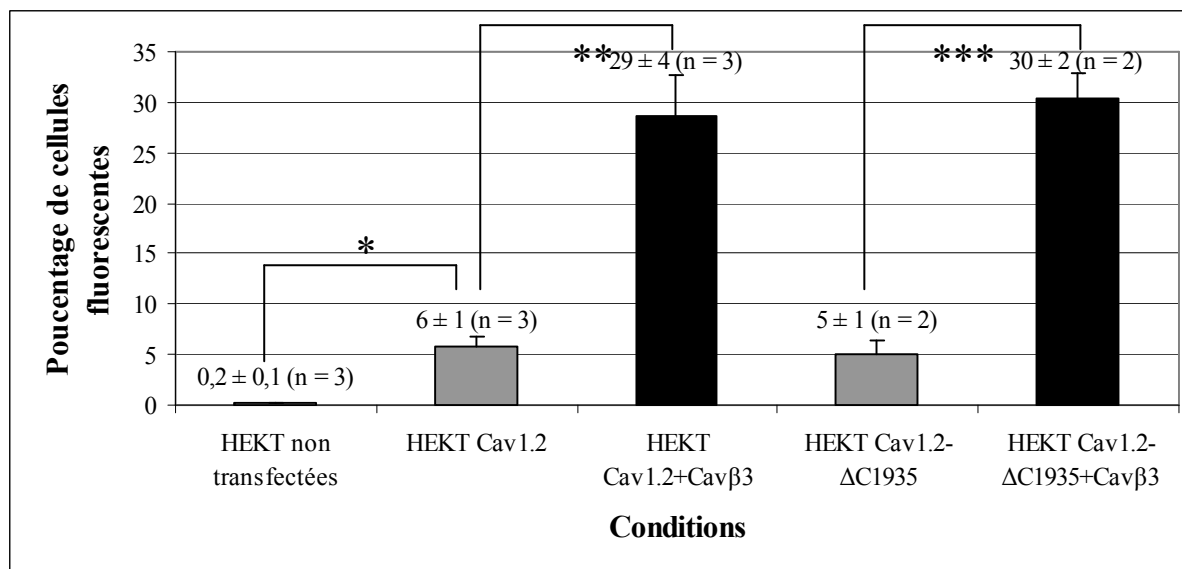


Figure 25. Histogramme comparant le nombre de cellules fluorescentes mesurées en condition témoin (HEK non transfectées) avec le nombre de cellules fluorescentes transfectées avec la sous-unité $Ca_v\alpha 1.2$ -HA $\Delta C1935$ mesuré en présence et en absence de la sous-unité auxiliaire $Ca_v\beta 3$. Le signal fluorescent mesuré sur les cellules entières est plus élevé lorsque la sous-unité $Ca_v\alpha 1.2$ -HA $\Delta C1935$ est exprimée en présence de la sous-unité auxiliaire $Ca_v\beta 3$. Les données des colonnes 1, 2 et 3 sont les mêmes que celles de la Figure 23 et les données des colonnes 4 et 5 représentent la compilation de deux expériences effectuées à des jours différents. Les astérisques indiquent les différences significatives qu'il existe entre les différentes expériences (* entre les HEKT non transfectées et les HEKT transfectées avec $Ca_v\alpha 1.2$ -HA « pleine longueur », ** entre les HEKT transfectées avec $Ca_v\alpha 1.2$ -HA « pleine longueur » en présence ou non de la sous-unité $Ca_v\beta 3$ et *** entre les HEKT transfectées avec $Ca_v\alpha 1.2$ -HA $\Delta C1935$ en présence ou non de la sous-unité $Ca_v\beta 3$).

Les résultats préliminaires obtenus dans les ovocytes de Xénope ont suggéré que des délétions plus importantes dans le C-terminal donnaient des résultats similaires à la délétion $\Delta C1935$. L'expression membranaire des délétions $\Delta C1856$ et $\Delta C1733$ a aussi été mesurée par FACS.

3.3.3 Le canal calcique $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ tronqué en position 1856

La Figure 26 montre une population de cellule composant la population M2 qui apparaît dans le cas où la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ est présente (pour une valeur de la FL1-H comprise entre 10^1 et 10^2). On remarque, encore comme il a été observé dans le cas de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA « pleine longueur » et tronquée en position 1856, que l'augmentation de fluorescence par rapport au témoin est faible mais significative ($p < 0,001$) 4 % ($n = 1$), dans le cas où la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ est absente. Ceci indique que ces cellules ne portent peu ou pas l'épitope HA à leur surface et donc que la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA $\Delta C1856$ n'est que peu ou pas exprimée à la membrane plasmique. Il n'y a pas de différence significative d'intensité de fluorescence entre les cellules transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA « pleine longueur » et celles exprimées la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA $\Delta C1856$, en l'absence de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$. Cette constatation diffère à nouveau de ce que nous avons observé dans les ovocytes de Xénope, puisque nous avons observé des courants calciques lorsque la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA $\Delta C1856$ avait été exprimée dans les ovocytes de Xénope en absence de sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$, ce qui avait montré que la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA $\Delta C1856$ se trouvait à la membrane plasmique. Les cellules composant la population M2 sont fluorescentes et portent l'épitope HA, ce qui laisse sous-entendre que la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA $\Delta C1856$ est exprimée à la membrane plasmique lorsque la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$ est présente.

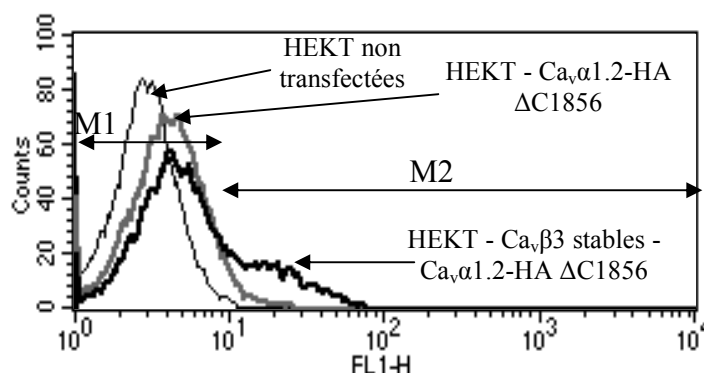


Figure 26. Résultats d'une expérience de FACS montrant la fluorescence des cellules HEKT transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1856}$ en présence ou en absence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$. Le trait noir fin montre les cellules HEKT non transfectées incubées avec l'anticorps anti HA couplé au FITC. Le trait gris épais montre les cellules HEKT transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1856}$. Le trait noir épais montre les cellules HEKT- $\text{Ca}_v\beta 3$ stables transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1856}$. L'axe des ordonnées représente le pourcentage de cellules détectées selon le signal fluorescent exprimé en abscisse (Données obtenues à partir d'une expérience unique).

Le nombre de cellules fluorescentes mesuré pour la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1856}$ exprimée seule en absence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$ n'est pas significativement différent ($p > 0,2$) de ce qui est mesuré pour la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ étiquetée HA exprimée seule en absence de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$. Le nombre de cellules fluorescentes mesuré pour la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ étiquetée HA ΔC1856 augmente quand elle est co-exprimée avec la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$ (23 % $n=1$) mais le pourcentage de cellules fluorescentes n'est pas significativement différent de ce qui a été observé pour $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA}$ « pleine longueur ». Ces résultats suggèrent que l'adressage à la membrane de la construction ΔC1856 est similaire au canal « pleine longueur » et celui tronqué en position 1935 et que ΔC1856 répond de la même manière à la modulation par la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ (Figure 27).

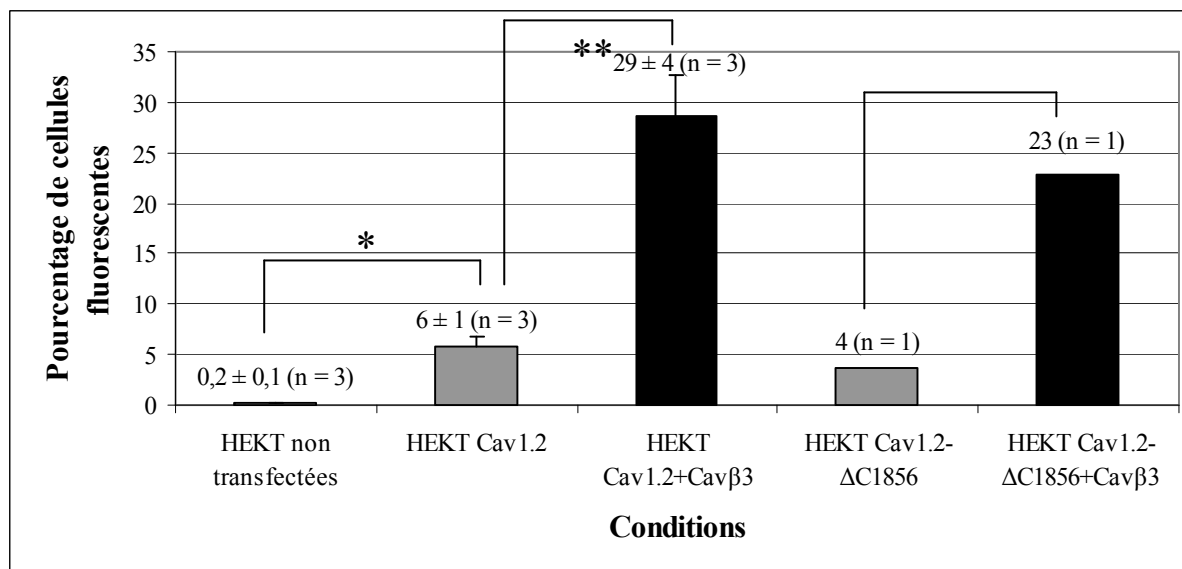


Figure 27. Histogramme comparant le nombre de cellules fluorescentes mesurées en condition témoin (HEK non transfectées) avec le nombre de cellules fluorescentes transfectées avec la sous-unité $Ca_v\alpha 1.2$ -HA $\Delta C1856$ mesuré en présence et en absence de la sous-unité auxiliaire $Ca_v\beta 3$. Le signal fluorescent mesuré sur les cellules entières est plus élevé lorsque la sous-unité $Ca_v\alpha 1.2$ -HA $\Delta C1856$ est exprimée en présence de la sous-unité auxiliaire $Ca_v\beta 3$. Les données des colonnes 1, 2, 3 sont les mêmes que celles de la Figure 23 et les données des colonnes 4 et 5 représentent la compilation de deux expériences effectuées à des jours différents. Les astérisques indiquent les différences significatives qui existent entre les différentes expériences (* entre les HEKT non transfectées et les HEKT transfectées avec $Ca_v\alpha 1.2$ -HA « pleine longueur », ** entre les HEKT transfectées avec $Ca_v\alpha 1.2$ -HA « pleine longueur » en présence ou non de la sous-unité $Ca_v\beta 3$).

La mesure de la fluorescence émise par l'anticorps Anti HA couplé au FITC donne un patron semblable pour la sous-unité $Ca_v\alpha 1$ -HA sauvage et la sous-unité $Ca_v\alpha 1$ -HA tronqué en position 1856.

3.3.4 Le canal $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ tronqué en position 1733

La Figure 28 montre aussi une population de cellules composant la population M2 qui apparaît dans le cas où la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ est présente (pour une valeur de la FL1-H comprise entre 10^1 et 10^2). On remarque, encore comme il a été observé dans le cas de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA « pleine longueur », tronquée en position 1935 et en position 1835, que l'augmentation de fluorescence par rapport au témoin est faible mais significative ($p < 0,001$) 6 % ($n = 1$), dans le cas où la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ est absente. Ceci indique que ces cellules ne portent peu ou pas l'épitope HA à leur surface et que la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA $\Delta C1733$ n'est que peu ou pas exprimée à la membrane plasmique. Il n'existe pas de différence significative d'intensité de fluorescence entre les cellules transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA « pleine longueur » et celles exprimées la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA $\Delta C1733$. Il s'agit à nouveau d'une différence par rapport à ce que nous avons observé dans les ovocytes de Xénope. En effet, nous avons mesuré des courants calciques lorsque la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA $\Delta C1733$ avait été exprimée dans les ovocytes de Xénope en absence de sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$, ce qui avait donc montré que la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA $\Delta C1733$ se trouvait à la membrane plasmique. Les cellules composant la population M2 sont fluorescentes et portent l'épitope HA, ce qui laisse sous-entendre que la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA $\Delta C1733$ est exprimée à la membrane plasmique lorsque la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$ est présente.

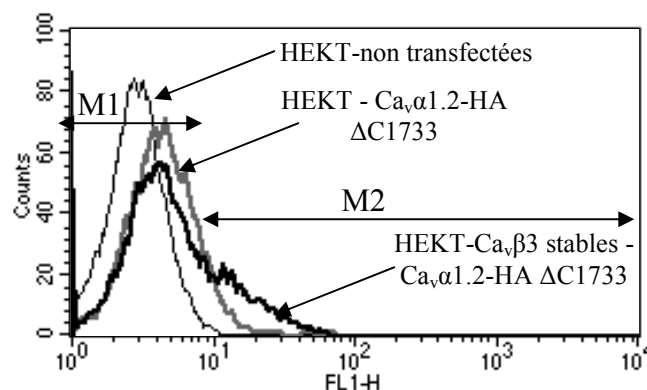


Figure 28. Résultats d'une expérience de FACS montrant la fluorescence des cellules HEKT transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1733}$ en présence ou en absence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$. Le trait noir fin montre les cellules HEKT non transfectées incubées avec l'anticorps anti HA couplé au FITC. Le trait gris épais montre les cellules HEKT transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1733}$. Le trait noir épais montre les cellules HEKT- $\text{Ca}_v\beta 3$ stables transfectées avec la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1733}$. L'axe des ordonnées représente le pourcentage de cellules détectées selon le signal fluorescent exprimé en abscisse (Données obtenues à partir d'une expérience unique).

Le nombre de cellules fluorescentes mesuré pour la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1733}$ exprimée seule en absence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$ n'est pas significativement différent ($p > 0,2$) de ce qui est mesuré pour la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ étiquetée HA exprimée seule en absence de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$. Le nombre de cellules fluorescentes augmente quand la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ étiquetée HA ΔC1733 est co-exprimée avec la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$ (21 % $n=1$) mais le pourcentage de cellules fluorescentes n'est pas significativement différent de ce qui a été observé pour $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA}$ « pleine longueur » dans les mêmes conditions. Ces résultats suggèrent que l'adressage à la membrane de la construction ΔC1733 est similaire à celui du canal « pleine longueur » et celui tronqué en position 1935 et 1856 et que ΔC1733 répond de la même manière à la modulation par la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ (Figure 29).

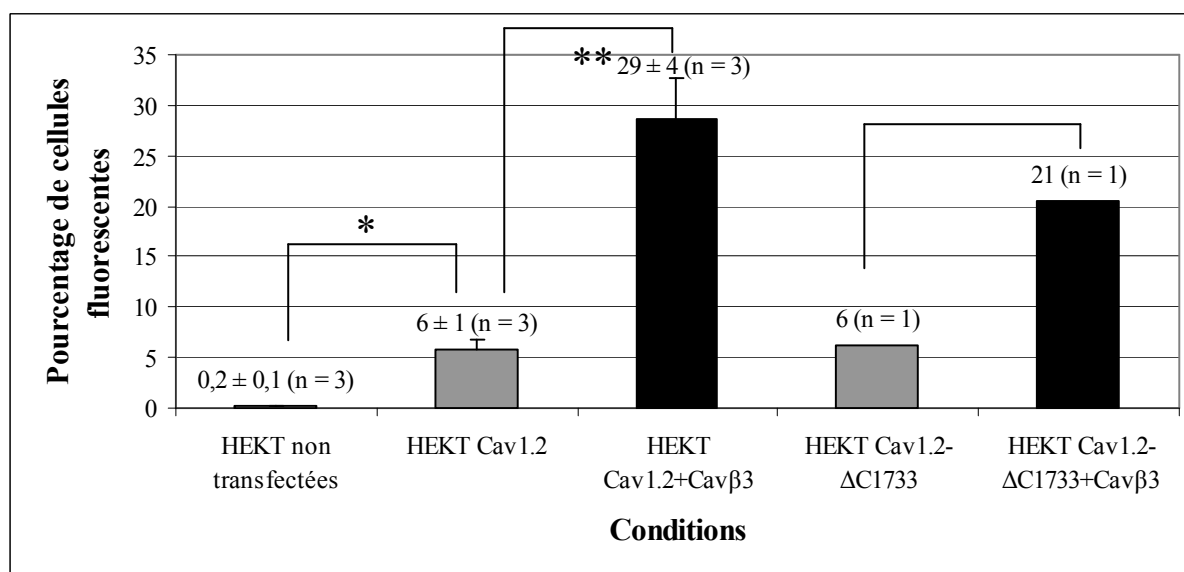


Figure 29. Histogramme comparant le nombre de cellules fluorescentes mesurées en condition témoin (HEK non transfectées) avec le nombre de cellules fluorescentes transfectées avec la sous-unité $Ca_v\alpha 1.2$ -HA $\Delta C1733$ mesuré en présence et en absence de la sous-unité auxiliaire $Ca_v\beta 3$. Le pourcentage de cellules fluorescentes n'est pas significativement différent entre la population de cellules HEKT transfectées avec la sous-unité $Ca_v\alpha 1$ -HA « pleine longueur » et celle transfectée avec sous-unité $Ca_v\alpha 1$ -HA $\Delta 1733$. ($6\% \pm 1$ pour la sous-unité de type sauvage et 6% pour la sous-unité tronquée.) Les colonnes 1, 2 et 3 sont les mêmes que la figure 14 et les colonnes 4 et 5 représentent la compilation de deux expériences effectuées à des jours différents. Les astérisques indiquent les différences significatives qui existent entre les différentes expériences (* entre les HEKT non transfectées et les HEKT transfectées avec $Ca_v\alpha 1.2$ -HA « pleine longueur », ** entre les HEKT transfectées avec $Ca_v\alpha 1.2$ -HA « pleine longueur » en présence ou non de la sous-unité $Ca_v\beta 3$).

Le Tableau 11 résume les résultats obtenus en FACS avec les différentes constructions testées.

Conditions	Cellules fluorescentes (%)
HEKT non transfectées	$0,2 \pm 0,1$ (n = 3)
HEKT Ca _v 1.2 de type sauvage	6 ± 1 (n = 3)
HEKT Ca _v 1.2 de type sauvage+ $\beta 3$	29 ± 4 (n = 3)
HEKT Ca _v 1.2 $\Delta C1935$	5 ± 1 (n = 2)
HEKT Ca _v 1.2 $\Delta C1935$ + $\beta 3$	30 ± 2 (n = 2)
HEKT Ca _v 1.2 $\Delta C1856$	4 (n = 1)
HEKT Ca _v 1.2 $\Delta C1856$ + $\beta 3$	23 (n = 1)
HEKT Ca _v 1.2 $\Delta C1733$	6 (n = 1)
HEKT Ca _v 1.2 $\Delta C1733$ + $\beta 3$	21 (n = 1)

Tableau 11 : Pourcentage de cellules fluorescentes selon les différentes conditions de transfection dans les cellules HEKT. La présence de la sous-unité Ca_v $\beta 3$ permet l'expression à la membrane plasmique de la sous-unité Ca_v $\alpha 1$ du canal calcique Ca_v1.2 de type sauvage et des sous-unités Ca_v $\alpha 1$ du canal calcique Ca_v1.2 tronquées en C-terminal.

4. DISCUSSION

Le canal calcique de type L, $Ca_v1.2$, appartient à la famille HVA des canaux calciques dépendants du voltage. Il a été identifié dans plusieurs organes et tissus (muscle cardiaque, muscle lisse, cellules endocrines et neuronales). Ce canal a pour rôle de faire entrer des ions calcium dans la cellule après une dépolarisation transitoire. L'activité et l'expression membranaire de $Ca_v1.2$ sont régulées par les sous-unités auxiliaires $Ca_v\beta$ et $Ca_v\alpha2\delta$. La sous-unité $Ca_v\beta$ intervient dans le gating du canal, c'est-à-dire à la fois dans l'activation et l'inactivation de ce dernier en se fixant principalement au domaine AID situé sur la boucle intracellulaire qui relie les domaines I et II de la sous-unité $Ca_v\alpha1$. Il a aussi été proposé qu'elle pourrait antagoniser un signal de rétention au réticulum endoplasmique présent sur la sous-unité $Ca_v\alpha1.2$ ce qui permettrait de cibler celle-ci à la membrane plasmique. La nature et la localisation du signal de rétention demeurent encore inconnues à ce jour.

Il a été observé pour la première fois en 1991, que le canal natif $Ca_v1.2$, extrait à partir de cellules ventriculaires du cœur de lapin, était de plus petit poids moléculaire par environ 50 kDa que le poids moléculaire prédit par la protéine recombinante (De Jongh, Warner et al. 1991). Ces observations suggéraient que le canal natif pouvait être tronqué en conditions physiologiques mais le site moléculaire responsable de ce phénotype était inconnu. De plus, la pertinence physiologique de cette observation pour le canal humain n'était pas claire. Une étude systématique de l'épissage alternatif de l'isoforme humaine de $Ca_v\alpha1.2$ a récemment mis en évidence la présence potentielle d'un codon stop au niveau de l'exon 45 (Liao, Yong et al. 2005). Une communication personnelle du Dr Ramon Brugada, quand il était professeur-clinicien à l'Institut de cardiologie de Montréal, a confirmé que 20 à 30 % des porteurs humains sains, possèdent un codon stop à la position 1905 ce qui termine prématurément la traduction de la protéine (communication personnelle non publiée, Dr Lucie Parent, 2007). Quoique nous ne possédions pas le clone humain à proprement parler, nous avons poursuivi nos travaux sur le clone du lapin (qui sert de référence pour les travaux dans le domaine, voir sections suivantes). La structure primaire de la sous-unité $Ca_v\alpha1.2$ est à 99% identique entre les deux isoformes à l'exception des 30 premiers acides aminés dans le N-terminal qui sont absents dans le clone humain. Cette différence cause un simple déplacement de 30 acides aminés dans la numérotation.

Malgré tout, précisons que cette différence provient de l'identification du codon stop de départ (ATG pour méthionine) sur laquelle les généticiens ne sont pas tous d'accord.

Nous avons testé les propriétés biophysiques de la mutation $\Delta C1905$ ($\Delta C1935$ dans le lapin) en présence et en absence de sous-unité auxiliaire $Ca_v\beta 3$ dans le contexte de récentes observations qui supposent que le C-terminal pourrait interagir avec la sous-unité auxiliaire $Ca_v\beta$ (Lao, Kobrinsky et al. 2008). Dans ce contexte, nous avons aussi évalué les propriétés biophysiques de la sous-unité $Ca_v\alpha 1.2$ après délétion de fragments plus importants (236 à 438 acides aminés avec les mutants $\Delta C1856$ et $\Delta C1733$ en présence et en absence de la sous-unité auxiliaire $Ca_v\beta 3$).

4.1 La délétion de 140 à 300 acides aminés ne change pas le patron d'adressage des sous-unités $Ca_v\alpha 1.2$ à la membrane dans les cellules HEKT

Nos données préliminaires obtenues après l'expression de ces mutants dans les ovocytes de Xénope indiquaient que la délétion d'une partie de l'extrémité C-terminale de la sous-unité $Ca_v\alpha 1.2$ (en position 2030, 1935, 1856 ou 1733) provoque, d'une part une augmentation significative des courants maximum par rapport à la protéine témoin (en présence des mêmes sous-unités auxiliaires $Ca_v\beta 3$ et $Ca_v\alpha 2\delta$) et la présence d'activité électrophysiologique significative en absence de sous-unité auxiliaire $Ca_v\beta 3$ (la sous-unité $Ca_v\alpha 2\delta$ étant toujours présente). Dans le cas du canal « pleine longueur », plusieurs années d'expérience dans le laboratoire ont démontré que l'ARNm de $Ca_v\alpha 1.2$ injecté dans les ovocytes de Xénope en absence de sous-unité $Ca_v\beta 3$ ne génère aucun courant entrant significatif ($<0,2 \mu A$).

Les propriétés biophysiques des sous-unités $Ca_v\alpha 1.2$ tronquées ne sont pas significativement différentes des propriétés de la sous-unité $Ca_v\alpha 1.2$ « pleine longueur » tel que documenté au laboratoire depuis plus de 10 ans. D'une part, les propriétés de gating (potentiel de mi-activation $V_{0,5,act}$, potentiel de mi-inactivation $V_{0,5,inact}$ et cinétiques d'inactivation τ_{800}) des canaux tronqués, en présence de la sous-unité $Ca_v\beta 3$ ne diffèrent que peu de celles caractérisant le canal « pleine longueur » (Tableaux 6 et 7). D'autre part, la sous-unité $Ca_v\beta 3$ continue à moduler l'activité électrophysiologique des sous-unités $Ca_v\alpha 1.2$ tronquées.

En effet, l'absence de sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ déplace le potentiel de mi-activation ($V_{0,5 \text{ act}}$) d'environ + 10 mV, ce qui indique que la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ facilite l'ouverture du canal. De plus, les cinétiques d'inactivation sont ralenties par l'absence de sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ comme nous l'avons démontré auparavant pour $\text{Ca}_v\alpha 2.3$ (Berrou, Bernatchez et al. 2001; Berrou, Dodier et al. 2005).

À première vue, nos résultats pouvaient suggérer qu'il existe un signal de rétention sur le C-terminal de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ et que ce signal doit être antagonisé par la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ pour permettre l'expression de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ à la membrane. Le groupe de DeWaard, a identifié la présence d'un signal de rétention sur la boucle I-II de la protéine $\text{Ca}_v\alpha 2.1$ (Bichet, Cornet et al. 2000; Cornet, Bichet et al. 2002). Ces travaux servent de référence dans le domaine mais aucune étude similaire n'a été reportée sur $\text{Ca}_v\alpha 1.2$. Toutefois, des travaux récents du groupe de Soldatov suggèrent que le C-terminal pourrait interagir avec la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta$ (Lao, Kobrinsky et al. 2008). Dans ce contexte, nous avons tenté de quantifier l'expression à la membrane de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ en présence et en absence de sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta$ et d'évaluer le rôle du C-terminal dans ce processus. Afin de quantifier l'expression de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ à la membrane plasmique, nous avons exprimé la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ étiquetée HA dans les cellules HEKT, un système d'expression de cellules de mammifères d'origine fibroblastique couramment utilisé comme système d'expression recombinante. Même s'il est discuté par certains (Lao, Kobrinsky et al. 2008), il est généralement reconnu que ces cellules n'expriment pas de façon endogène la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta$ contrairement aux ovocytes de Xénope où la concentration en sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ est autour de 17 nM (Canti, Davies et al. 2001). Cette concentration serait suffisante pour permettre l'expression du moins de $\text{Ca}_v 2.3$ à la membrane (Tareilus, Roux et al. 1997).

Tous les résultats précédents ont été obtenus par électrophysiologie avec la méthode du voltage imposé à deux électrodes. Le courant macroscopique obtenu dans ces conditions est le produit de trois paramètres : le nombre de canaux à la membrane (n), la probabilité d'ouverture du canal (P_o) et le courant unitaire (ΔI). Ainsi, le courant total observé est traduit par l'équation $I_{\text{total}} = nP_o\Delta I$. Dans le cas de la méthode du voltage imposé à deux électrodes, il est impossible de distinguer lequel des paramètres est responsable de l'augmentation des courants macroscopiques.

La méthode de cytométrie de flux (FACS) a été choisie pour nous permettre de quantifier la présence de $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ à la membrane et d'évaluer l'importance du nombre de canaux « n » dans l'augmentation des courants macroscopiques observés après les délétions du C-terminal. L'expression de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA a été estimée par cytométrie de flux en quantifiant le signal fluorescent obtenu avec l'anticorps anti HA couplé au FITC par rapport au signal fluorescent obtenu en absence d'anticorps et/ou en mesurant la fluorescence intrinsèque des cellules HEKT non transfectées. Cette approche permet de détecter la fluorescence de cellules HEKT intactes. L'épitope HA a été inséré dans une région extracellulaire de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ du canal calcique $\text{Ca}_v1.2$. L'épitope HA a été choisi du fait de sa petite taille (neuf acides aminés YPYDVPDYA) qui serait moins susceptible de perturber la fonction du canal. Cet épitope a été inséré sur la boucle reliant les segments 1 et 2 du domaine I de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ en ne changeant pas le cadre de lecture et en n'insérant aucune délétion et/ou mutation dans la séquence originale. Cette position a été choisie car elle ne possède pas de site de glycosylation et elle se situe dans une région peu sensible du canal. De ce fait, l'insertion de l'épitope HA a très peu modifié les propriétés du canal $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ du moins celles exprimée dans les ovocytes de Xénope.

Les résultats obtenus par la technique de FACS ont montré que la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 3$ augmente significativement le nombre de protéines $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA « pleine longueur » présent à la membrane et qu'en absence de $\text{Ca}_v\beta 3$, la protéine $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA ne s'exprime pas ou peu à la membrane (Tableau 10). Les délétions de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA (ΔC1935 , ΔC1856 et ΔC1733) s'expriment aussi à la membrane plasmique en présence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$, mais en absence de celle-ci, nous observons le même patron d'expression que la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA « pleine longueur » à la membrane, ce qui diffère de ce que nous avons observé dans les ovocytes de Xénope. Cette différence est discutée dans la section 4.3. Nos résultats confirment les travaux précédents des groupes de Birnbaumer, Hosey et Catterall (Voir section 4.2) et suggèrent que le nombre de sous-unités $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ mesuré en régime établi ou « steady-state » n'est pas augmenté par les délétions de la région distale du C-terminal. Nos résultats contredisent toutefois à première vue les conclusions du groupe de Soldatov pour qui le C-terminal contient un signal d'interaction avec la sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ (Lao, Kobrinsky et al. 2008). Il faut cependant préciser que l'interaction additionnelle entre la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ et $\text{Ca}_v\beta$ a été détectée entre le C-terminal de $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ et le C-terminal de $\text{Ca}_v\beta 2$ alors que nous avons travaillé avec $\text{Ca}_v\beta 3$. Il serait par conséquent intéressant de vérifier en FACS l'expression à la membrane de nos constructions en présence de $\text{Ca}_v\beta 2a$.

4.2 Travaux précédents sur le rôle du C-terminal de $\text{Ca}_v\alpha 1.2$

Nous avons, pour la première fois, quantifié l'expression membranaire de $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ en présence et en absence de $\text{Ca}_v\beta$. De plus, nous avons étudié le rôle que joue le C-terminal de $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ dans ce processus. Nous ne sommes toutefois pas le premier groupe à étudier et rapporter les propriétés biophysiques des canaux $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ tronqués en C-terminal. Déjà, en 1994, le groupe de Birnbaumer et de Stefani a étudié les délétions $\text{Ca}_v\alpha 1.2 \Delta\text{C1856}$, ΔC1733 et Δ1700 de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ de lapin après expression recombinante dans les ovocytes de Xénope. Toutes les constructions étudiées ont généré des courants macroscopiques 4 à 6 fois supérieurs par rapport à la protéine $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ « pleine longueur » (Wei, Neely et al. 1994). Grâce à la méthode du « Cut-Open Oocyte », qui permet de mesurer directement le courant généré par l'ouverture du canal plutôt que le courant généré par le flux des ions dans le canal, les chercheurs ont démontré que les charges déplacées lors de l'activation restaient inchangées dans le cas des délétions par rapport au canal « pleine longueur ». Le nombre de canaux « n » $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ à la membrane ne serait pas altéré par la délétion de la région distale du C-terminal. Les expériences de patch-clamp ont aussi indiqué que la conductance unitaire des canaux ΔI n'était pas changée. L'explication de ce groupe serait que la présence des délétions en C-terminal faciliterait le couplage entre la dépendance au voltage et l'ouverture du canal et que, par conséquence, la probabilité d'ouverture P_o serait augmentée (Wei, Neely et al. 1994). Toutefois, leurs travaux ont été effectués en présence de la sous-unité $\text{Ca}_v\beta 2a$ dans les ovocytes de Xénope et les chercheurs n'ont pas évalué le rôle des sous-unités auxiliaires $\text{Ca}_v\beta$ dans ce processus.

En 2001, le groupe de Marlene Hosey a étudié le rôle du C-terminal de $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ de lapin dans les cellules HEKT en mesurant les courants macroscopiques des délétions $\text{Ca}_v\alpha 1.2 \Delta\text{C2024}$, ΔC1935 et Δ1733 en présence de $\text{Ca}_v\beta 2a$ (Gao, Cuadra et al. 2001). Comme l'avait observé le groupe de Birnbaumer en 1994, les délétions du C-terminal de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ provoquent une augmentation significative des courants macroscopiques. Ces constatations ont amené les auteurs à conclure qu'il existerait un signal inhibiteur qui se situerait après la position 2024, en C-terminal. Le C-terminal distal pourrait se replier sur la portion proximale de ce même segment. Des expériences d'immunoprécipitation avec la molécule GST ont montré que le signal inhibiteur se situerait entre les positions 2024 et 2171 et que ce peptide serait susceptible de s'apparier avec la région 1733-1905.

La liaison de ce motif sur les régions proximales du C-terminal agirait comme un rétrocontrôle négatif et inhiberait les courants du canal $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ (Gao, Cuadra et al. 2001). Il n'est toutefois pas clair que le repliement de ce motif sur la portion proximal du C-terminal pourrait affecter le flux ionique à travers le canal dans une région éloignée du pore.

Plus récemment, le groupe de Catterall a confirmé que les délétions du C-terminal de la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ (ΔC1821 , ΔC1731 , ΔC1701 , ΔC1693) augmentent les courants macroscopiques par rapport au canal témoin pleine longueur. Pour faire suite aux travaux du groupe de Hosey, Catterall émet l'hypothèse que le C-terminal est tronqué *in vivo* et que le peptide issu de la protéolyse du C-terminal distal (acides aminés 1822-2171) inhiberait de manière importante les courants macroscopiques. Leurs résultats montrent en effet une diminution des courants obtenus avec les constructions tronquées lorsqu'elles sont perfusées avec le peptide dans la pipette en configuration « whole-cell ». Selon Catterall (et en accord avec la conclusion de Hosey), la liaison du peptide réduit l'efficacité du couplage entre le senseur du voltage et l'ouverture du canal, ce qui est observé par un déplacement du potentiel de mi-activation vers des potentiels plus positifs. D'après des prédictions de structures pour protéines cytosoliques obtenues avec le programme Rosetta, les acides aminés R1696 et R1697 pourraient former en partie le site de liaison. La mutation des acides aminés R1696 et R1697 et des acides aminés E2103, E2104 et E2106 a en effet diminué l'effet du peptide inhibiteur, c'est-à-dire que le déplacement du potentiel d'activation n'était plus affecté et les courants maximum n'étaient plus inhibés. Catterall conclut que l'augmentation des courants macroscopiques observés systématiquement après délétion du C-terminal résulterait de l'absence du peptide inhibiteur, ce qui se traduirait par une augmentation de la probabilité d'ouverture des canaux (P_o) (Hulme, Yarov-Yarovoy et al. 2006). Toutefois, de nombreuses questions demeurent. En effet, la présence du peptide induit un déplacement positif du $V_{0,5,act}$ vers + 30 mV ce qui n'est pas compatible avec les mesures documentées pour la protéine $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ « pleine longueur ». De plus, comme dans les études précédentes, le groupe de Catterall n'a pas étudié le rôle des sous-unités auxiliaires $\text{Ca}_v\beta$ dans ce processus. Aussi, le mécanisme moléculaire par lequel un repliement conformationnel quelconque du C-terminal affecterait le flux ionique à travers le pore formé par les segments S6 nous échappe toujours. Finalement, lorsque nous avons testé la délétion $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-}\Delta\text{C1700}$ dans les ovocytes de Xénope, nous ne sommes pas parvenus à obtenir des courants en présence et en absence de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$. De plus, le docteur Benoîte Bourdin a aussi testé la construction $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA-}\Delta\text{C1700}$ dans les cellules HEKT. La technique de FACS a montré que le canal ne s'exprimait pas à la membrane.

Ceci ne concorde ainsi pas avec ce que propose Catterall, puisque qu'ils observent des courants en testant avec la technique de patch-clamp, des cellules HEKT transfectées avec la délétion $\Delta C1693$.

4.3 Limites expérimentales de nos expériences

La cytométrie de flux sur cellules intactes nous a permis de mesurer précisément et de façon reproductible l'expression à la membrane des sous-unités $Ca_v\alpha 1.2$ -HA. Cette méthode présente des avantages certains sur la technique de biotinylation, qui permet de détecter, après immunoprécipitation (avec le complexe biotine-streptavidine) et analyse par immunobuvardage de type Western, uniquement les protéines situées à la membrane de la cellule. La réponse obtenue par cette technique nous indique uniquement si le canal est présent ou non à la membrane plasmique. Des expériences de similaires de FACS sur les sous-unités homologues $Ca_v\alpha 1.2$ -HA et $Ca_v\alpha 2.3$ -HA ont généré des signaux beaucoup plus faibles (Benoîte Bourdin, Ph.D. communication personnelle). Nous avons toutefois noté que la population de cellules fluorescentes portant $Ca_v\alpha 1.2$ -HA à la membrane ne dépassait jamais 35% même en présence de la sous-unité $Ca_v\beta 3$. Plusieurs facteurs peuvent influencer ces observations. Par exemple, cette valeur peut être influencée par le taux de transfection de $Ca_v\alpha 1.2$ -HA. En effet, nous avons choisi de transfecter transitoirement $Ca_v\alpha 1.2$ -HA dans une lignée stable de $Ca_v\beta 3$. Nos signaux auraient peut-être été augmentés en produisant des cellules stables possédant les sous-unités $Ca_v\alpha 1.2$ -HA, $Ca_v\beta 3$ et $Ca_v\alpha 2\delta$. De plus, nous nous serions rapprochés davantage des conditions physiologiques. Pour l'instant, toutefois, notre lignée stable $Ca_v\beta 3$ utilise le même antibiotique de sélection (généticine) que la sous-unité $Ca_v\alpha 1.2$ -HA ce qui rend impossible la production d'une double lignée stable. Pour une raison que nous ignorons, la sous-unité $Ca_v\beta 3$ sous-clonée dans le vecteur pZeocin, et qui utilise la Zéocine comme antibiotique de sélection semble être traduite de façon moins efficace comme en témoignent les immunobuvardages de type Western (Benoîte Bourdin, Ph.D. communication personnelle). De plus, plusieurs tentatives de lignées stables $Ca_v\alpha 1.2$ -HA (pCMV-Tag5a)/ $Ca_v\beta 3$ (pZeocin) ont été effectuées sans succès.

Le maximum de fluorescence détecté dans nos conditions expérimentales pourrait être aussi limité par l'inaccessibilité relative de l'épitope HA par l'anticorps fluorescent anti HA couplé au FITC.

Dans le but d'évaluer l'importance de la localisation de l'épitope HA dans la mesure de la fluorescence des travaux sont présentement en cours au laboratoire dans lesquels la position de l'épitope est déplacée dans d'autres domaines dans la région extracellulaire immédiatement adjacente en IIS5 et IIIS5 (Benoîte Bourdin, Ph.D. communication personnelle).

Nous avons aussi cherché à normaliser le taux de fluorescence M2 à la membrane plasmique sur la valeur de fluorescence obtenue à partir de cellules HEKT complètement perméabilisées. Plusieurs approches de perméabilisation cellulaire ont été testées par Benoîte Bourdin mais toutes les méthodes utilisées optimisées pour les cellules fixées utilisées en microscopie confocale produisaient des signaux de fluorescence démesurés en conditions témoins (cellules HEKT non transfectées (Benoîte Bourdin, Ph.D. communication personnelle)).

Le docteur Benoîte Bourdin a même testé le DM-BODIPY-DHP qui devrait détecter toutes les sous-unités $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ (qu'elles soient ou non à la membrane). Le DM-BODIPY-DHP est un antagoniste fluorescent et membrane-perméable de $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ qui est vendu commercialement par Molecular Probes (Eugene, Oregon). Et de nouveau nous avons obtenu les mêmes résultats.

Les prochaines expériences viseront à visualiser la distribution cellulaire de $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA en microscopie confocale. Parmi les différents marqueurs de compartiments intracellulaires, il sera possible d'utiliser des anticorps contre LAMP2 (marqueur du lysosome), le PDI ou la calnexine (marqueur du réticulum endoplasmique) et Rab5 (marqueur des endosomes précoces). Au moment de déposer ce mémoire, Yolaine Dodier vient tout juste de compléter le sous-clonage du gène codant pour la GFP (Green Fluorescence Protein) après le C-terminal de $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ -HA. Ce clone nous permet d'envisager des expériences en double marquage fluorescent pour distinguer la distribution intracellulaire et membranaire de $\text{Ca}_v\alpha 1.2$.

Il n'en demeure pas moins que les résultats obtenus suggèrent des différences importantes dans l'expression des sous-unités $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ tronquées en absence de sous-unité $\text{Ca}_v\beta$ entre les mesures d'électrophysiologie dans les ovocytes de Xénope et les mesures de FACS obtenues à partir des cellules HEKT. Nous avons dans un premier temps, supposé que le choix du système d'expression est important, puisque nous observons des différences notoires quant à l'expression du canal $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ à la membrane plasmique. Nous avons remarqué des courants significatifs lorsque nous avons mesurés les courants induits par l'expression des sous-unités $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ tronquées en C-terminal en absence de sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$.

Les expériences de FACS montrent au contraire que les sous-unités $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ tronquées migrent peu ou pas à la membrane dans les mêmes conditions en absence de sous-unités $\text{Ca}_v\beta 3$. Afin de réconcilier les différences observées entre les deux systèmes d'expression, nous avons injecté directement dans le noyau des ovocytes de Xénope, l'ADN plasmidique de nos constructions. Les résultats des expériences sont présentés et comparés aux expériences effectuées après l'injection en ARN (Tableau 11). L'expression en absence de sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$, la délétion $\text{Ca}_v\alpha 1.2\text{-HA } \Delta\text{C1935}$ ne s'exprime que très peu lorsqu'elle a été injectée en ADN. L'expression normale est aussi observée au jour 5 ou jour 7 si l'on injecte de l'ADN, contrairement à jour 2 ou 3 dans le cas où l'ARN est injecté. Il est donc possible que l'ARNm transcrit in vitro et injecté dans les ovocytes soit plus stable (1/2 vie plus longue) ou que la synthèse protéique soit facilitée, grâce au vecteur (pGEM) à partir duquel l'ARN est synthétisé.

Nous concluons provisoirement que l'expression du canal $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ dans les ovocytes de Xénope se faisant par injection d'ARNm préalablement synthétisé in vitro peut induire une surexpression protéique ce qui expliquerait la forte amplitude des courants que nous observons et qui serait plus notable après délétion de C-terminal. Nous avons constaté que la sous-unité $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ tronquée en C-terminal montrait des courants plus faibles que ce que nous avons obtenu après injection en ARN, ce qui appuierait l'hypothèse que l'ARNm synthétisé serait plus stable.

5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Quatre groupes de recherche indépendants confirment que la délétion du C-terminal distal (jusqu'à 438 acides aminés) de $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ de lapin (Genbank X15539) augmente les courants macroscopiques que $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ soit exprimé soit dans les ovocytes de Xénope (groupe de Birnbaumer, nos travaux) soit dans les cellules HEKT (groupes de Hosey et Catterall). Ces résultats ont été obtenus en présence soit de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 2a$ (groupes de Birnbaumer et Hosey), soit de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 1b$ (groupe de Catterall), soit de la sous-unité auxiliaire $\text{Ca}_v\beta 3$ (nos travaux). Nos résultats confirment, par une méthode quantitative et directe, que l'augmentation des courants macroscopiques, après la délétion de 236 à 438 acides aminés dans la partie distale du C-terminal de $\text{Ca}_v\alpha 1.2$, ne résulte probablement pas d'un changement dans le nombre « n » de canaux $\text{Ca}_v 1.2$ exprimé à la membrane plasmique. Nous devons de ce fait conclure par inférence comme les groupes précédents que le produit $\Delta i P_o$ est augmenté après délétion du C-terminal. Pour distinguer ces éléments, il faudra effectuer des mesures en canal unitaire, c'est-à-dire mesurer l'activité d'un canal isolé et il sera alors possible de déterminer le P_o et le Δi de l'équation traduisant le courant macroscopique. Cependant, la mesure de l'activité du canal $\text{Ca}_v 1.2$ en canal unitaire demeure une prouesse technique. En effet, les temps d'ouverture du canal sont très courts (moins de 1 ms) et la mesure exacte de Δi se fait souvent en présence de l'agoniste Bay8644 qui augmente le temps moyen des ouvertures et permet ainsi une meilleure détection des sauts de courants. Il nous est cependant difficile de conclure comme les groupes précédents que l'absence de la partie distale du C-terminal stabilise l'état ouvert. Deux arguments d'ordre biophysique appuient notre raisonnement. En effet, il serait surprenant que les délétions du C-terminal stabilisent l'état ouvert parce que nous n'observons aucun changement dans les potentiels de mi-activation $V_{0,5,act}$ et de mi-inactivation $V_{0,5,inact}$ et même des cinétiques d'inactivation (τ_{800}). Nous avons documenté dans un travail précédent que la stabilisation de l'état ouvert se traduit soit par un déplacement vers des potentiels négatifs de $V_{0,5,act}$ soit par une diminution des cinétiques d'inactivation soit encore une combinaison des deux ((Raybaud, Baspinar et al. 2007) pour $\text{Ca}_v 2.3$, Sébastien Wall-Lacelle pour $\text{Ca}_v 1.2$, communication personnelle). Ces changements sont significatifs lorsque l'hydrophobicité des résidus de la région IIS6 est diminuée. À la lumière de nos résultats, force est de conclure que le mécanisme moléculaire responsable de l'augmentation des courants macroscopiques après la délétion de la région distale du C-terminal de $\text{Ca}_v\alpha 1.2$ nous échappe toujours.

6 RÉFÉRENCES

- Andrade, A., A. Sandoval, et al. (2007). "Proteolytic cleavage of the voltage-gated Ca²⁺ channel $\alpha_2\delta$ subunit: structural and functional features." *Eur J Neurosci* **25**(6): 1705-10.
- Arikkath, J. and K. P. Campbell (2003). "Auxiliary subunits: essential components of the voltage-gated calcium channel complex." *Curr Opin Neurobiol* **13**(3): 298-307.
- Auld, V. J., A. L. Goldin, et al. (1990). "A neutral amino acid change in segment IIS4 dramatically alters the gating properties of the voltage-dependent sodium channel." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(1): 323-7.
- Berjukow, S., R. Marksteiner, et al. (2001). "Amino acids in segment IVS6 and beta-subunit interaction support distinct conformational changes during Ca(v)2.1 inactivation." *J Biol Chem* **276**(20): 17076-82.
- Bernatchez, G., L. Berrou, et al. (2001). "Role of Repeat I in the fast inactivation kinetics of the Ca(V)2.3 channel." *Biochim Biophys Acta* **1514**(2): 217-29.
- Berridge, M. J. (1997). "Elementary and global aspects of calcium signalling." *J Physiol* **499** (Pt 2): 291-306.
- Berridge, M. J., M. D. Bootman, et al. (2003). "Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(7): 517-29.
- Berrou, L., G. Bernatchez, et al. (2001). "Molecular determinants of inactivation within the I-II linker of α_1E (CaV2.3) calcium channels." *Biophys J* **80**(1): 215-28.
- Berrou, L., Y. Dodier, et al. (2005). "The C-terminal residues in the α -interacting domain (AID) helix anchor CaV beta subunit interaction and modulation of CaV2.3 channels." *J Biol Chem* **280**(1): 494-505.
- Berrou, L., H. Klein, et al. (2002). "A specific tryptophan in the I-II linker is a key determinant of beta-subunit binding and modulation in Ca(V)2.3 calcium channels." *Biophys J* **83**(3): 1429-42.
- Bers, D. M. (2002). "Cardiac excitation-contraction coupling." *Nature* **415**(6868): 198-205.
- Bezanilla, F. (2000). "The voltage sensor in voltage-dependent ion channels." *Physiol Rev* **80**(2): 555-92.
- Bichet, D., V. Cornet, et al. (2000). "The I-II loop of the Ca²⁺ channel α_1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit." *Neuron* **25**(1): 177-90.
- Bird, G. S., W. I. DeHaven, et al. (2008). "Methods for studying store-operated calcium entry." *Methods* **46**(3): 204-12.
- Birnbaumer, L., K. P. Campbell, et al. (1994). "The naming of voltage-gated calcium channels." *Neuron* **13**(3): 505-6.
- Birnbaumer, L., E. Yildirim, et al. (2003). "A comparison of the genes coding for canonical TRP channels and their M, V and P relatives." *Cell Calcium* **33**(5-6): 419-32.
- Borjesson, S. I. and F. Elinder (2008). "Structure, function, and modification of the voltage sensor in voltage-gated ion channels." *Cell Biochem Biophys* **52**(3): 149-74.
- Bourinet, E., T. W. Soong, et al. (1999). "Splicing of α_1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels." *Nat Neurosci* **2**(5): 407-15.
- Bourinet, E., S. C. Stotz, et al. (2001). "Interaction of SNX482 with domains III and IV inhibits activation gating of α_1E (Ca(V)2.3) calcium channels." *Biophys J* **81**(1): 79-88.
- Brice, N. L., N. S. Berrow, et al. (1997). "Importance of the different beta subunits in the membrane expression of the α_1A and α_2 calcium channel subunits: studies using a depolarization-sensitive α_1A antibody." *Eur J Neurosci* **9**(4): 749-59.

- Cabrera-Vera, T. M., J. Vanhauwe, et al. (2003). "Insights into G protein structure, function, and regulation." *Endocr Rev* **24**(6): 765-81.
- Canti, C., A. Davies, et al. (2001). "Evidence for two concentration-dependent processes for beta-subunit effects on alpha1B calcium channels." *Biophys J* **81**(3): 1439-51.
- Catterall, W. A. (1986). "Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels." *Annu Rev Biochem* **55**: 953-85.
- Catterall, W. A., E. Perez-Reyes, et al. (2005). "International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels." *Pharmacol Rev* **57**(4): 411-25.
- Cheng, X., J. Liu, et al. (2007). "A novel Ca(V)1.2 N terminus expressed in smooth muscle cells of resistance size arteries modifies channel regulation by auxiliary subunits." *J Biol Chem* **282**(40): 29211-21.
- Cibulsky, S. M. and W. A. Sather (2003). "Control of ion conduction in L-type Ca²⁺ channels by the concerted action of S5-6 regions." *Biophys J* **84**(3): 1709-19.
- Clapham, D. E. (2003). "TRP channels as cellular sensors." *Nature* **426**(6966): 517-24.
- Cornet, V., D. Bichet, et al. (2002). "Multiple determinants in voltage-dependent P/Q calcium channels control their retention in the endoplasmic reticulum." *Eur J Neurosci* **16**(5): 883-95.
- Dafi, O., L. Berrou, et al. (2004). "Negatively charged residues in the N-terminal of the AID helix confer slow voltage dependent inactivation gating to CaV1.2." *Biophys J* **87**(5): 3181-92.
- De Jongh, K. S., C. Warner, et al. (1991). "Characterization of the two size forms of the alpha 1 subunit of skeletal muscle L-type calcium channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(23): 10778-82.
- Dietrich, A., V. Chubanov, et al. (2006). "Cation channels of the transient receptor potential superfamily: their role in physiological and pathophysiological processes of smooth muscle cells." *Pharmacol Ther* **112**(3): 744-60.
- Dong, Z., P. Saikumar, et al. (2006). "Calcium in cell injury and death." *Annu Rev Pathol* **1**: 405-34.
- Doyle, D. A., J. Morais Cabral, et al. (1998). "The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity." *Science* **280**(5360): 69-77.
- Dresviannikov, A. V., K. M. Page, et al. (2009). "Determinants of the voltage dependence of G protein modulation within calcium channel beta subunits." *Pflugers Arch* **457**(4): 743-56.
- El-Yazbi, A. F., W. J. Cho, et al. (2008). "Calcium extrusion by plasma membrane calcium pump is impaired in caveolin-1 knockout mouse small intestine." *Eur J Pharmacol* **591**(1-3): 80-7.
- Elinder, F., J. Nilsson, et al. (2007). "On the opening of voltage-gated ion channels." *Physiol Behav* **92**(1-2): 1-7.
- Ellis, S. B., M. E. Williams, et al. (1988). "Sequence and expression of mRNAs encoding the alpha 1 and alpha 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel." *Science* **241**(4873): 1661-4.
- Ertel, E. A., K. P. Campbell, et al. (2000). "Nomenclature of voltage-gated calcium channels." *Neuron* **25**(3): 533-5.
- Favre, I., E. Moczydlowski, et al. (1996). "On the structural basis for ionic selectivity among Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ in the voltage-gated sodium channel." *Biophys J* **71**(6): 3110-25.
- Fox, A. P., M. C. Nowicky, et al. (1987). "Kinetic and pharmacological properties distinguishing three types of calcium currents in chick sensory neurones." *J Physiol* **394**: 149-72.

- Gao, T., A. E. Cuadra, et al. (2001). "C-terminal fragments of the alpha 1C (CaV1.2) subunit associate with and regulate L-type calcium channels containing C-terminal-truncated alpha 1C subunits." *J Biol Chem* **276**(24): 21089-97.
- Gerhardstein, B. L., T. Gao, et al. (2000). "Proteolytic processing of the C terminus of the alpha(1C) subunit of L-type calcium channels and the role of a proline-rich domain in membrane tethering of proteolytic fragments." *J Biol Chem* **275**(12): 8556-63.
- Guy, H. R. and P. Seetharamulu (1986). "Molecular model of the action potential sodium channel." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(2): 508-12.
- Hackos, D. H., T. H. Chang, et al. (2002). "Scanning the intracellular S6 activation gate in the shaker K⁺ channel." *J Gen Physiol* **119**(6): 521-32.
- Hagiwara, S., S. Ozawa, et al. (1975). "Voltage clamp analysis of two inward current mechanisms in the egg cell membrane of a starfish." *J Gen Physiol* **65**(5): 617-44.
- Hall, D. D., J. A. Feekes, et al. (2006). "Binding of protein phosphatase 2A to the L-type calcium channel Cav1.2 next to Ser1928, its main PKA site, is critical for Ser1928 dephosphorylation." *Biochemistry* **45**(10): 3448-59.
- Hell, J. W., C. T. Yokoyama, et al. (1993). "Differential phosphorylation of two size forms of the neuronal class C L-type calcium channel alpha 1 subunit." *J Biol Chem* **268**(26): 19451-7.
- Hering, S., S. Aczel, et al. (1996). "Transfer of high sensitivity for benzothiazepines from L-type to class A (BI) calcium channels." *J Biol Chem* **271**(40): 24471-5.
- Hering, S., S. Berjukow, et al. (1998). "Ca²⁺ channel block and inactivation: common molecular determinants." *Trends Pharmacol Sci* **19**(11): 439-43.
- Herzig, S., I. F. Khan, et al. (2007). "Mechanism of Ca(v)1.2 channel modulation by the amino terminus of cardiac beta2-subunits." *FASEB J* **21**(7): 1527-38.
- Huber, I., E. Wappl, et al. (2000). "Conserved Ca²⁺-antagonist-binding properties and putative folding structure of a recombinant high-affinity dihydropyridine-binding domain." *Biochem J* **347 Pt 3**: 829-36.
- Hulme, J. T., T. W. Lin, et al. (2003). "Beta-adrenergic regulation requires direct anchoring of PKA to cardiac CaV1.2 channels via a leucine zipper interaction with A kinase-anchoring protein 15." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(22): 13093-8.
- Hulme, J. T., R. E. Westenbroek, et al. (2006). "Phosphorylation of serine 1928 in the distal C-terminal domain of cardiac CaV1.2 channels during beta1-adrenergic regulation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(44): 16574-9.
- Hulme, J. T., V. Yarov-Yarovoy, et al. (2006). "Autoinhibitory control of the CaV1.2 channel by its proteolytically processed distal C-terminal domain." *J Physiol* **576**(Pt 1): 87-102.
- Jay, S. D., S. B. Ellis, et al. (1990). "Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle." *Science* **248**(4954): 490-2.
- Jiang, Y., A. Lee, et al. (2002). "Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel." *Nature* **417**(6888): 515-22.
- Jiang, Y., V. Ruta, et al. (2003). "The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K⁺ channel." *Nature* **423**(6935): 42-8.
- Jurkovicova, D., B. Sedlakova, et al. (2008). "Hypoxia differently modulates gene expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in mouse kidney and HEK 293 cell line." *Ann N Y Acad Sci* **1148**: 421-7.
- Kaneko, S., C. B. Cooper, et al. (2002). "Identification and characterization of novel human Ca(v)2.2 (alpha 1B) calcium channel variants lacking the synaptic protein interaction site." *J Neurosci* **22**(1): 82-92.
- Kawasaki, T., I. Lange, et al. (2009). "A minimal regulatory domain in the C terminus of STIM1 binds to and activates ORAI1 CRAC channels." *Biochem Biophys Res Commun*.

- Kitaguchi, T., M. Sukhareva, et al. (2004). "Stabilizing the closed S6 gate in the Shaker Kv channel through modification of a hydrophobic seal." *J Gen Physiol* **124**(4): 319-32.
- Klugbauer, N., L. Lacinova, et al. (1999). "Molecular diversity of the calcium channel $\alpha 2\delta$ subunit." *J Neurosci* **19**(2): 684-91.
- Klugbauer, N., E. Marais, et al. (2003). "Calcium channel $\alpha 2\delta$ subunits: differential expression, function, and drug binding." *J Bioenerg Biomembr* **35**(6): 639-47.
- Kraus, R. L., M. J. Sinnegger, et al. (1998). "Familial hemiplegic migraine mutations change $\alpha 1A$ Ca^{2+} channel kinetics." *J Biol Chem* **273**(10): 5586-90.
- Kuo, A., J. M. Gulbis, et al. (2003). "Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state." *Science* **300**(5627): 1922-6.
- Labro, A. J., A. L. Raes, et al. (2008). "Kv channel gating requires a compatible S4-S5 linker and bottom part of S6, constrained by non-interacting residues." *J Gen Physiol* **132**(6): 667-80.
- Lacinova, L. (2005). "Voltage-dependent calcium channels." *Gen Physiol Biophys* **24 Suppl 1**: 1-78.
- Lao, Q. Z., E. Kobrinsky, et al. (2008). "New Determinant for the CaVbeta2 subunit modulation of the CaV1.2 calcium channel." *J Biol Chem* **283**(23): 15577-88.
- Lee, S. Y., A. Lee, et al. (2005). "Structure of the KvAP voltage-dependent K^{+} channel and its dependence on the lipid membrane." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(43): 15441-6.
- Leroy, J., M. W. Richards, et al. (2005). "Interaction via a key tryptophan in the I-II linker of N-type calcium channels is required for beta1 but not for palmitoylated beta2, implicating an additional binding site in the regulation of channel voltage-dependent properties." *J Neurosci* **25**(30): 6984-96.
- Lian, L. Y., D. Myatt, et al. (2007). "Apo calmodulin binding to the L-type voltage-gated calcium channel Cav1.2 IQ peptide." *Biochem Biophys Res Commun* **353**(3): 565-70.
- Liao, P., T. F. Yong, et al. (2005). "Splicing for alternative structures of Cav1.2 Ca^{2+} channels in cardiac and smooth muscles." *Cardiovasc Res* **68**(2): 197-203.
- Lin, Z., K. Witschas, et al. (2008). "A critical GxxxA motif in the gamma6 calcium channel subunit mediates its inhibitory effect on Cav3.1 calcium current." *J Physiol* **586**(Pt 22): 5349-66.
- Llinas, R. and Y. Yarom (1981). "Electrophysiology of mammalian inferior olivary neurones in vitro. Different types of voltage-dependent ionic conductances." *J Physiol* **315**: 549-67.
- Llinas, R. R., M. Sugimori, et al. (1989). "Voltage-dependent calcium conductances in mammalian neurons. The P channel." *Ann N Y Acad Sci* **560**: 103-11.
- Long, S. B., E. B. Campbell, et al. (2005). "Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K^{+} channel." *Science* **309**(5736): 897-903.
- Maltez, J. M., D. A. Nunziato, et al. (2005). "Essential Ca(V)beta modulatory properties are AID-independent." *Nat Struct Mol Biol* **12**(4): 372-7.
- Martyn, J. A., M. J. Fagerlund, et al. (2009). "Basic principles of neuromuscular transmission." *Anaesthesia* **64 Suppl 1**: 1-9.
- McNaughton, N. C., C. H. Davies, et al. (2004). "Inhibition of $\alpha(1E)$ $Ca(2+)$ channels by carbonic anhydrase inhibitors." *J Pharmacol Sci* **95**(2): 240-7.
- Mintz, I. M., V. J. Venema, et al. (1992). "P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA." *Nature* **355**(6363): 827-9.
- Mitra, R. and M. Morad (1986). "Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**(14): 5340-4.
- Moreno, H., B. Rudy, et al. (1997). "beta subunits influence the biophysical and pharmacological differences between P- and Q-type calcium currents expressed in a mammalian cell line." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(25): 14042-7.

- Newcomb, R., B. Szoke, et al. (1998). "Selective peptide antagonist of the class E calcium channel from the venom of the tarantula *Hysterocrates gigas*." *Biochemistry* **37**(44): 15353-62.
- Nishizawa, M. and K. Nishizawa (2008). "Molecular dynamics simulation of Kv channel voltage sensor helix in a lipid membrane with applied electric field." *Biophys J* **95**(4): 1729-44.
- Noceti, F., P. Baldelli, et al. (1996). "Effective gating charges per channel in voltage-dependent K⁺ and Ca²⁺ channels." *J Gen Physiol* **108**(3): 143-55.
- Nowycky, M. C., A. P. Fox, et al. (1985). "Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity." *Nature* **316**(6027): 440-3.
- Parent, L. and M. Gopalakrishnan (1995). "Glutamate substitution in repeat IV alters divalent and monovalent cation permeation in the heart Ca²⁺ channel." *Biophys J* **69**(5): 1801-13.
- Parent, L., T. Schneider, et al. (1997). "Subunit regulation of the human brain alpha 1E calcium channel." *J Membr Biol* **160**(2): 127-40.
- Perez-Reyes, E., A. L. Van Deusen, et al. (2009). "Molecular pharmacology of human Cav3.2 T-type Ca²⁺ channels: block by antihypertensives, antiarrhythmics, and their analogs." *J Pharmacol Exp Ther* **328**(2): 621-7.
- Perozo, E., D. M. Cortes, et al. (1999). "Structural rearrangements underlying K⁺-channel activation gating." *Science* **285**(5424): 73-8.
- Putney, J. W., Jr. (2009). "SOC: now also store-operated cyclase." *Nat Cell Biol* **11**(4): 381-2.
- Qin, N., S. Yagel, et al. (2002). "Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel alpha(2)delta-4 subunit." *Mol Pharmacol* **62**(3): 485-96.
- Randall, A. and C. D. Benham (1999). "Recent advances in the molecular understanding of voltage-gated Ca²⁺ channels." *Mol Cell Neurosci* **14**(4-5): 255-72.
- Raybaud, A., E. E. Baspinar, et al. (2007). "The role of distal S6 hydrophobic residues in the voltage-dependent gating of CaV2.3 channels." *J Biol Chem* **282**(38): 27944-52.
- Raybaud, A., Y. Dodier, et al. (2006). "The role of the GX9GX3G motif in the gating of high voltage-activated Ca²⁺ channels." *J Biol Chem* **281**(51): 39424-36.
- Richards, M. W., J. Leroy, et al. (2007). "The HOOK-domain between the SH3 and the GK domains of Cavbeta subunits contains key determinants controlling calcium channel inactivation." *Channels (Austin)* **1**(2): 92-101.
- Shannon, T. R., K. S. Ginsburg, et al. (2000). "Potentiation of fractional sarcoplasmic reticulum calcium release by total and free intra-sarcoplasmic reticulum calcium concentration." *Biophys J* **78**(1): 334-43.
- Shapiro, M. S., J. Gomez, et al. (2001). "Identification of subtypes of muscarinic receptors that regulate Ca²⁺ and K⁺ channel activity in sympathetic neurons." *Life Sci* **68**(22-23): 2481-7.
- Snutch, T. P., J. P. Leonard, et al. (1990). "Rat brain expresses a heterogeneous family of calcium channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(9): 3391-5.
- Stotz, S. C., J. Hamid, et al. (2000). "Fast inactivation of voltage-dependent calcium channels. A hinged-lid mechanism?" *J Biol Chem* **275**(32): 24575-82.
- Stotz, S. C., S. E. Jarvis, et al. (2004). "Functional roles of cytoplasmic loops and pore lining transmembrane helices in the voltage-dependent inactivation of HVA calcium channels." *J Physiol* **554**(Pt 2): 263-73.
- Stotz, S. C. and G. W. Zamponi (2001). "Identification of inactivation determinants in the domain IIS6 region of high voltage-activated calcium channels." *J Biol Chem* **276**(35): 33001-10.
- Stuhmer, W., F. Conti, et al. (1989). "Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel." *Nature* **339**(6226): 597-603.

- Sun, Y. B., F. Lou, et al. (2009). "Calcium- and myosin-dependent changes in troponin structure during activation of heart muscle." *J Physiol* **587**(Pt 1): 155-63.
- Tareilus, E., M. Roux, et al. (1997). "A *Xenopus* oocyte beta subunit: evidence for a role in the assembly/expression of voltage-gated calcium channels that is separate from its role as a regulatory subunit." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(5): 1703-8.
- Tsien, R. W., D. Lipscombe, et al. (1988). "Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation." *Trends Neurosci* **11**(10): 431-8.
- Van Petegem, F., F. C. Chatelain, et al. (2005). "Insights into voltage-gated calcium channel regulation from the structure of the CaV1.2 IQ domain-Ca²⁺/calmodulin complex." *Nat Struct Mol Biol* **12**(12): 1108-15.
- Van Petegem, F., K. A. Clark, et al. (2004). "Structure of a complex between a voltage-gated calcium channel beta-subunit and an alpha-subunit domain." *Nature* **429**(6992): 671-5.
- Van Petegem, F., K. E. Duderstadt, et al. (2008). "Alanine-scanning mutagenesis defines a conserved energetic hotspot in the CaValpha1 AID-CaVbeta interaction site that is critical for channel modulation." *Structure* **16**(2): 280-94.
- Van Petegem, F. and D. L. Minor, Jr. (2006). "The structural biology of voltage-gated calcium channel function and regulation." *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 5): 887-93.
- Vennekens, R., T. Voets, et al. (2002). "Current understanding of mammalian TRP homologues." *Cell Calcium* **31**(6): 253-64.
- Walker, D., D. Bichet, et al. (1998). "A beta 4 isoform-specific interaction site in the carboxyl-terminal region of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha 1A subunit." *J Biol Chem* **273**(4): 2361-7.
- Walker, D. and M. De Waard (1998). "Subunit interaction sites in voltage-dependent Ca²⁺ channels: role in channel function." *Trends Neurosci* **21**(4): 148-54.
- Wang, W. Y., L. Y. Hao, et al. (2009). "CaMKII phosphorylates a threonine residue in the C-terminal tail of Cav1.2 Ca(2+) channel and modulates the interaction of the channel with calmodulin." *J Physiol Sci*.
- Webster, S. M., D. Del Camino, et al. (2004). "Intracellular gate opening in Shaker K⁺ channels defined by high-affinity metal bridges." *Nature* **428**(6985): 864-8.
- Wei, X., A. Neely, et al. (1994). "Modification of Ca²⁺ channel activity by deletions at the carboxyl terminus of the cardiac alpha 1 subunit." *J Biol Chem* **269**(3): 1635-40.
- Wu, X. S., H. D. Edwards, et al. (2000). "Side chain orientation in the selectivity filter of a voltage-gated Ca²⁺ channel." *J Biol Chem* **275**(41): 31778-85.
- Yamakage, M. and A. Namiki (2002). "Calcium channels--basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels--a review." *Can J Anaesth* **49**(2): 151-64.
- Yarotskyy, V. and K. S. Elmslie (2009). "omega-conotoxin GVIA alters gating charge movement of N-type (CaV2.2) calcium channels." *J Neurophysiol* **101**(1): 332-40.
- Yellen, G. (1998). "The moving parts of voltage-gated ion channels." *Q Rev Biophys* **31**(3): 239-95.
- Yoshii, M., A. Tsunoo, et al. (1988). "Gating and permeation properties of two types of calcium channels in neuroblastoma cells." *Biophys J* **54**(5): 885-95.
- Zhang, J. F., P. T. Ellinor, et al. (1994). "Molecular determinants of voltage-dependent inactivation in calcium channels." *Nature* **372**(6501): 97-100.
- Zhang, Y., Y. H. Chen, et al. (2008). "Origin of the voltage dependence of G-protein regulation of P/Q-type Ca²⁺ channels." *J Neurosci* **28**(52): 14176-88.